

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 741**

51 Int. Cl.:
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05723687 .9**
96 Fecha de presentación: **25.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1737493**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.01.2007**

54 Título: **INHIBIDORES DEL RECEPTOR 1 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE TIPO INSULINA PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES.**

30 Prioridad:
25.02.2004 US 547516 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.11.2011

73 Titular/es:
**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
44 BINNEY STREET
BOSTON, MA 02115, US**

72 Inventor/es:
**KUNG, Andrew;
MITSIADES, Constantine, S. y
MITSIADES, Nicholas**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 368 741 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores del receptor 1 del factor de crecimiento de tipo insulina para inhibir el crecimiento de células tumorales.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a la inhibición del crecimiento de células tumorales.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los factores de crecimiento semejantes a la insulina 1 (IGF-1) y 2 (IGF-2) se han implicado en la patofisiología de un amplio rango de neoplasias humanas debido a las propiedades mitogénicas y antiapoptóticas mediadas por su receptor de tipo I (IGF-1 R o CD221). La expresión de IGF-1 R funcional se requiere para la transformación neoplásica en diversos modelos de tumorigénesis. Sin embargo, la técnica no ha aplicado la inhibición de la ruta de IGF-1 R como una estrategia terapéutica anti-cancerosa principal, debido, en parte, a la ausencia de moléculas pequeñas inhibitoras de la función de IGF-1 R clínicamente aplicables y, en parte, a la incertidumbre acerca del impacto clínico de inhibir la ruta de IGF/IGF-1R en la proliferación y supervivencia de las células tumorales. Además, la expresión generalizada de IGF-1R en los tejidos normales suscita preocupaciones respecto a la especificidad y la toxicidad de la inhibición de la ruta IGF/IGF-1R.

15 WO 02/092599 se refiere a derivados de 4-amino-5-fenil-7-ciclobutil-pirrol[2,3-d] pirimidina, a métodos para su preparación y a usos en el tratamiento de enfermedades proliferativas tales como tumor.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención es basa, en parte, en el descubrimiento de múltiples estrategias para la inhibición específica de la función de IGF-1 R, que tienen potentes efectos anti-tumorales en un amplio rango de tipos de tumor.

20 En varios aspectos, la presente descripción proporciona métodos para inhibir el crecimiento de las células tumorales mediante la administración a un sujeto o poniendo en contacto un tejido con un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico y una composición que contiene un inhibidor del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1R).

25 Específicamente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico y una composición que comprende un inhibidor del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1R), en el que dicho inhibidor de IGF-1R es ADW-742 o NVP-AEW541.

30 Un segundo aspecto de la presente invención proporciona específicamente el uso de un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico y una composición que comprende un inhibidor del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1R) par uso en la fabricación de un medicamento de combinación para inhibir el crecimiento de células de mieloma múltiple en un sujeto, en el que dicho inhibidor de IGF-1R es ADW-742 o NVP-AEW541.

35 El inhibidor de IGF-1 R se administra simultáneamente con el agente citotóxico o agente quimioterapéutico. Alternativamente, el inhibidor de IGF-1 R se administra después del agente citotóxico o agente quimioterapéutico. Por ejemplo, el inhibidor de IGF-1R se administra 1, 2, 3, 6, 12, 24 ó 48 horas o más después del agente citotóxico o agente quimioterapéutico. El inhibidor de IGF-1 R se administra como una única dosis o en múltiples dosis durante un periodo de tiempo preseleccionado.

Por ejemplo, el inhibidor de IGF-1R se administra durante 1-2 días. La dosis es sub-terapéutica.

De manera óptima, el inhibidor de IGF-1R se proporciona en una dosis suficiente para causar homeostasis aberrante de glucosa. Por ejemplo, el inhibidor de IGF-1R se proporciona a dosis para causar hiperglucemia, cetosis o glucosuria en el sujeto.

40 Un agente citotóxico es cualquier agente capaz de causar la muerte celular tal como terapia con radiación o un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico es cualquier agente usado típicamente para tratar cáncer. Los agentes quimioterapéuticos ejemplares son doxorubicina, melfalán o dexametasona.

Esta descripción también se refiere a aspectos y usos adicionales (que no entran en el alcance de las reivindicaciones).

45 En un aspecto de esta descripción el crecimiento de las células tumorales se inhibe mediante la administración a un sujeto de una primera composición que contiene un compuesto que disminuye la concentración (por ejemplo, concentración sérica o concentración en el microentorno del tumor) de los factores de crecimiento semejantes a la insulina (por ejemplo, IGF-1 o IGF-2) y una segunda composición que comprende un inhibidor del receptor del factor de

5 crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1 R). Los IGF (por ejemplo, IGF-1) son producidos por el hígado. Alternativamente, los IGF son producidos por las células estromales tumorales y/o estromales asociadas a un tumor. Los compuestos que disminuyen la concentración de IGF-1 son conocidos en la técnica e incluyen somatostatina o análogos de ésta. La segunda composición se administra simultáneamente con la primera composición. Alternativamente, la segunda composición se administra después de la primera composición (por ejemplo, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 horas o más).

10 Un aspecto adicional de esta descripción proporciona métodos para inhibir el crecimiento de las células tumorales mediante la administración a un sujeto de una composición que incluye un inhibidor del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1 R) y un agente anti-diabético. El agente anti-diabético es un polipéptido de insulina, un potenciador de la sensibilidad a la insulina (por ejemplo, tiazolidindiona o una biguanida) y un potenciador de la secreción de la insulina (por ejemplo, un inhibidor de glicosidasas).

Un aspecto más adicional de esta descripción proporciona un método para inhibir el crecimiento de las células tumorales mediante la administración a un sujeto de una composición que incluye un compuesto que disminuye la expresión (por ejemplo, la expresión en la superficie celular) o actividad de un IGF-1R. Opcionalmente, el método incluye además administrar al sujeto una composición que contiene un inhibidor de IGF-1R.

15 Los compuestos que disminuyen la expresión o actividad de un IGF-1 R incluyen por ejemplo un siARN o un ácido nucleico anti-sentido de IGF-1 R. Los compuestos adicionales incluyen aquellos compuestos que inhiben la circulación intracelular del IGF-1R; inhiben la modificación posterior a la traducción del IGF-1 R; potencian la degradación o ubiquitinación del IGF-1 R; o interrumpen la conformación tridimensional apropiada del IGF-1R.

20 La descripción proporciona además métodos para reducir la angiogénesis en un tejido, por ejemplo tejido tumoral, o inducir la apoptosis en una célula, poniendo en contacto la célula o tejido con un inhibidor del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1R).

25 A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por el experto en la técnica a la que esta invención pertenece. Aunque en la práctica o ensayo de la invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, los métodos y materiales adecuados se describen más adelante. En el caso de conflicto, la presente Especificación, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y reivindicaciones siguientes.

30 DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1a** es un gráfico de barras que demuestra la actividad anti-tumoral *in vitro* de los inhibidores de IGF-1R ADW-742 (0,5 μ M), α -IR3 (2 μ g/ml) y JB-1 (2 μ g/ml) frente a la línea celular MM-1R resistente a dexametasona. Las células se incubaron con inhibidores de IGF-1R (o sus controles respectivos, DMSO, anticuerpo MslgG1 o péptido codificado) o un anticuerpo neutralizante de IL-6R (10 μ g/ml) durante 2 días en presencia o ausencia de suero. Los resultados se expresan respecto a su control de vehículo respectivo.

La **Figura 1b** es un gráfico de barras que demuestra los resultados del efecto de α -IR3 2 μ g/ml o ADW-742 0,5 μ M durante 72 horas en un panel de líneas celulares MM sensibles y resistentes a fármacos, así como líneas celulares de carcinoma de próstata, mama y tiroides. Los resultados se presentan como el % de supresión del incremento inducido por suero en la población total de células tumorales viables.

40 La **Figura 1c** es un gráfico de barras que demuestra la actividad *in vitro* de α -IR3, ADW-742 y anti-IL-6R (concentración como se ha especificado en 1a) frente a células tumorales MM primarias aisladas de un paciente resistente a quimioterapia convencional y de alta dosis, talidomida, el derivado inmunomodulador de talidomida CC-5013 y PS-341.

La **Figura 1d** es un gráfico que demuestra la actividad *in vitro* de α -IR3 y ADW-742 frente a un panel de células tumorales MM primarias aisladas de pacientes resistentes a terapias convencionales e investigacionales. La **Figura 1e** es un gráfico que muestra la matriz de respuesta a la dosis de un panel de líneas celulares de MM (letras negras), otras malignidades hematológicas (letras rojas) y tumores sólidos (letras azules) a ADW-742 a 0-10 μ M durante 72 horas. La supervivencia relativa se visualiza en una escala de color asignada.

La **Figura 2a** es una imagen fotográfica que demuestra los resultados representativos de formación de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo completo de ratones SCID/NOD a los que se inyectaron i.v. 5×10^6 células MM humanas MM-1S-Luc⁺. Las imágenes 3 semanas después de la inyección de las células revelan lesiones en la espina dorsal, cráneo, y pelvis, con la progresión eventual a enfermedad difusa.

ES 2 368 741 T3

La **Figura 2b** es un gráfico de líneas que demuestra la cuantificación de la carga tumoral total en ratones que reciben ADW-742 (10 mg/kg i.p. dos veces al día durante 19 días) frente a ratones tratados con vehículo. Los datos se representan como media \pm SD, n=6 por grupo.

5 La **Figura 2c** es un gráfico de líneas que demuestra la curva de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones SCID/NOD tratados con ADW-742 frente a ratones control. Los ratones se trataron durante 19 días a las dosis indicadas en la Figura 2b. Los ratones tratados con ADW-742 tuvieron una supervivencia global mayor que los ratones control (38 días frente a 21 días, respectivamente, $P=0,02$, ensayo de rango logarítmico).

10 La **Figura 3a** es un gráfico que demuestra la agrupación jerárquica no supervisada de perfiles transcripcionales de células MM-1S cultivadas durante los tiempos indicados en presencia o ausencia de 10% suero fetal bovino, ADW-742 0,5 μ M, α -IR3 2 μ g/ml o IGF-1 200 ng/mL.

15 La **Figura 3b** es un gráfico de barras que demuestra los resultados densitométricos de análisis proteómicos del estado de señalización de células MM-1S cultivadas en medio que contiene suero en presencia o ausencia de ADW-742 a 0,5 μ M. Los resultados del estado de fosforilación y niveles totales (Figura 3c) de los mediadores de la señalización en el marco del tratamiento con ADW-742 se representan como % de los controles respectivos (media de 2 replicados independientes \pm SD). La especificidad de las secuelas mencionadas anteriormente de la inhibición de IGF-1R está indicada por la ausencia de efecto significativo (NS) en los controles negativos respectivos, incluyendo los niveles totales de quinasas tales como MEK1/2 o el estado de fosforilación de dianas tales como el receptor NMDA. Todas las demás diferencias fueron significativas con $p<0,05$.

20 La **Figura 3c** es un gráfico de barras que demuestra los resultados densitométricos de análisis proteómicos del estado de señalización de células MM-1S cultivadas en medio que contiene suero en presencia o ausencia de ADW-742 a 0,5 μ M. Los resultados que miden los niveles totales de los mediadores de la señalización en el marco del tratamiento con ADW-742 se representan como % de los controles respectivos (media de 2 replicados independientes \pm SD). La especificidad de las secuelas mencionadas anteriormente de la inhibición de IGF-1R está indicada por la ausencia de efecto significativo (NS) en los controles negativos respectivos, incluyendo los niveles totales de quinasas tales como MEK1/2 o el estado de fosforilación de dianas tales como el receptor NMDA. Todas las demás diferencias fueron significativas con $p<0,05$.

25 La **Figura 4a** es un gráfico de barras que muestra el efecto de la inhibición de IGF-1R en la actividad del proteasoma 20S. Las células MM1S se crecieron durante 24 horas en presencia o ausencia de 10% suero fetal bovino, α -IR3 2 μ g/ml, ADW-742 0,5 μ M o anticuerpo anti-IL-6R 2 μ g/ml.

30 La **Figura 4b** es una fotografía y un gráfico de barras que demuestran el efecto de la inhibición de IGF-1R en la actividad telomerasa.

La **Figura 4c** es un gráfico de barras que demuestra el efecto de la inhibición de IGF-1R en la actividad de unión al ADN de NF- κ B.

35 La **Figura 4d** es un gráfico de barras que demuestra el efecto de la inhibición de IGF-1R en la actividad de unión al ADN de HIF-1 α .

40 La **Figura 5** es una colección de imágenes fotográficas de transferencias Western que demuestra los efectos de la inhibición de IGF-1R en las cascadas de señalización anti-apoptóticas. Estos análisis de inmunotransferencia confirmatorios indican que el tratamiento con ADW-742 (500 nM) de células MM-1S en medio que contiene suero indujo eventos moleculares pleiotrópicos anti-proliferativos/pro-apoptóticos, tales como supresión temprana de la fosforilación de Akt, MEK1/2 y FKRHL-1, así como disminución de los niveles intracelulares de Akt, Bmx, IKK- α y el estimulador osteoclastogénico (y mediador de la resorción ósea en lesiones osteolíticas de MM) RANKL.

La **Figura 6a** es un gráfico de barras que muestra que las actividades *in vitro* anti-MM de dexametasona (Dex, 0,1 μ M, 72 horas) están potenciadas por el tratamiento con ADW-742 (750 nM para las 24 horas finales de la incubación) en células MM-1S.

45 La **Figura 6b** es un gráfico de barras que muestra que las actividades *in vitro* anti-MM de doxorubicina (Doxo, 50 ng/ml, 48 horas) están potenciadas por el tratamiento con ADW-742 (750 nM para las 24 horas finales de la incubación) en células MM-1S.

50 La **Figura 6c** es un gráfico de barras que demuestra que la inhibición de IGF-1R (por α -IR3 2 μ g/ml) potencia la actividad de PS-341 (2 nM, incubación toda la noche) frente a células MM-1S. Las células se cultivaron en presencia de 10% FBS y los resultados se expresan como la media \pm SD de 3 experimentos independientes.

ES 2 368 741 T3

- La **Figura 6d** es un gráfico de líneas que muestra los resultados de estudios en los que, dos semanas después de una inyección i.v. con células MM-1S-Luc, un grupo de ratones NOD-SCID con lesiones de MM difusas establecidas se dividió en 4 cohortes, con una carga tumoral estadísticamente equivalente como se evalúa por formación de imágenes de bioluminiscencia. Las cohortes se trataron con melfalán solo (2,5 mg/kg i.p. una vez a la semana), ADW-742 solo (10 mg/kg i.p. dos veces al día, cuatro días a la semana), melfalán seguido 18 horas después de ADW-742, o vehículo control. ADW-742 potenció el efecto anti-tumoral *in vivo* del melfalán, como se muestra por la prolongación de la supervivencia global de los ratones que recibieron la combinación de los 2 agentes (ensayo de rango logarítmico, $P=0,0008$).
- La **Figura 7a** es una colección de registros que muestra los análisis por citometría de flujo de IGF-1R en la superficie celular (curvas sombreadas) en líneas celulares MM sensibles a fármacos y resistentes a fármacos (MM-1S, MM-1R, RPMI-8226/S, RPMI-8226/Dox40, OCI-My5, OPM-1, S6B45), células tumorales MM primarias de pacientes resistentes a fármacos convencionales o investigacionales (paciente MM #1, #2, #3). Los resultados son representativos del panel completo de muestras tumorales ensayadas y de análisis con 2 mAb diferentes específicos anti-IGF-1R. Las curvas sin sombrear corresponden a controles con isotipo equivalente.
- La **Figura 7b** es una colección de registros que muestra los análisis por citometría de flujo de IGF-1R en la superficie celular (curvas sombreadas) en líneas celulares de tumores sólidos (carcinoma de células renales ACHN y CAKI-1, carcinoma de mama MCF-7 y MDA-MB-231, carcinoma de próstata PC-3 y LNCaP, carcinoma colorrectal SW-480 y cáncer de ovario SKOV-3). Los resultados son representativos del panel completo de muestras tumorales ensayadas y de análisis con 2 mAb diferentes específicos anti-IGF-1R. Las curvas sin sombrear corresponden a controles con isotipo equivalente.
- La **Figura 8a** es un gráfico de líneas que demuestra que en presencia de suero, las células MM INA-6 responden a IL-6 a la concentración indicada como se muestra por ensayos MTT después de 72 horas de incubación. Sin embargo, esta capacidad de respuesta se suprime en ausencia de suero o después de co-tratamiento con ADW-742 (500 nM).
- La **Figura 8b** es un gráfico de líneas que demuestra que en presencia de suero, las células de cáncer de próstata PC-3 responden a IL-6 a la concentración indicada como se muestra por ensayos MTT después de 72 horas de incubación. Sin embargo, esta capacidad de respuesta se suprime en ausencia de suero o después de co-tratamiento con ADW-742 (500 nM).
- La **Figura 9** es una colección de registros que demuestra la expresión en la superficie celular e intracelular de IGF-2R en células malignas. Análisis representativos de citometría de flujo de IGF-2R en la superficie celular (curvas con línea gris medio) e intracelular (curvas sombreadas) en células de mieloma múltiple (OPM-2, MM-SV, MM-AS, KMMI, S6B45, U266, K620) y células de leucemia (HL-60, REH). (Las curvas negras y gris claro corresponden a controles con isotipo equivalente para los análisis de IGF-2R en la superficie celular e intracelular, respectivamente).
- La **Figura 10** es una ilustración de una tabla que muestra la firma transcripcional de la estimulación de IGF-1.
- La **Figura 11a** es un gráfico de barras que indica que ADW-742 (750 nM para las 24 horas finales de incubación) y α -IR3 (2 μ g/ml para las 24 horas finales de incubación) potencian la sensibilidad de las células MM-1S a dexametasona (0,1 μ M durante 72 h).
- La **Figura 11b** es un gráfico de barras que indica que ADW-742 (750 nM para las 24 horas finales de incubación) y α -IR3 (2 μ g/ml para las 24 horas finales de incubación) potencian la sensibilidad de las células MM-1S a doxorubicina (50 ng/ml durante 48 h).
- La **Figura 11c** es un gráfico de barras que indica que ADW-742 (750 nM para las 24 horas finales de incubación) y α -IR3 (2 μ g/ml para las 24 horas finales de incubación) potencian la sensibilidad de las células MM-1S a melfalán (1 μ M durante 48 h).
- La **Figura 12a** es un diagrama de dispersión que muestra los resultados de análisis de citometría de flujo de células mononucleares de médula ósea (BM) no purificadas de aspirado de BM de paciente MM (que contiene células MM CD138⁺ y células normales CD138⁻ del microentorno óseo, tales como células estromales) después de cultivo en 20% suero, con o sin ADW-742 durante 72 horas. El tratamiento con ADW-742 (500 nM) da lugar a una supresión significativa de la población CD138⁺ de células malignas pero no de células estromales de BM.
- La **Figura 12b** es un gráfico de barras que indica que ADW-742 (500 nM durante 72 h) no afecta significativamente la viabilidad de células estromales de BM (BMSC), según se evalúa por el ensayo colorimétrico de supervivencia MTT.

ES 2 368 741 T3

- La **Figura 12c** es un gráfico de barras que demuestra que el co-cultivo de células MM con BMSC durante 24 h desencadena un incremento en los niveles de IGF-1 en el sobrenadante del co-cultivo. Los niveles de IGF-1 en el sobrenadante se ensayaron por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).
- 5 La **Figura 12d** es un gráfico de barras que indica que la inhibición de IGF-1R con ADW-742 (500 nM durante 24 h) suprime la secreción constitutiva e inducida por el co-cultivo de VEGF por las células de mieloma y BMSC.
- La **Figura 12e** es un gráfico de barras que indica que ADW-742 (750 nM) suprime la secreción de VEGF inducida por IGF-1 (200 ng/mL en medio sin suero) por las células de carcinoma de tiroides papilar SW579.
- 10 La **Figura 13** es un esquema que muestra los resultados comparativos del efecto de NVP-AEW541 durante 72 horas en un panel de líneas celulares MM sensibles y resistentes a fármacos. Los resultados se presentan como el % de supresión del incremento inducido por el suero en la población total de células tumorales viables.
- La **Figura 14** es un gráfico de barras que muestra la actividad *in vitro* de NVP-AEW541 frente a un panel de células tumorales MM primarias aisladas de pacientes resistentes a terapias convencionales e investigacionales.
- 15 La **Figura 15** es un gráfico de barras que muestra la actividad *in vitro* de NVP-AEW541 (0,5 μ M) y anti-IL-6R frente a células tumorales MM primarias aisladas de un paciente resistente a quimioterapia citotóxica, talidomida, CC-5013 y PS-341.
- La **Figura 16** es un gráfico de líneas que muestra que la inhibición de IGF-1R suprime la capacidad de respuesta de las células tumorales a IL-6. En presencia de suero, las células MM primarias responden a IL-6 a la concentración indicada según se muestra por ensayos MTT después de 72 horas de incubación. Sin embargo, esta capacidad de respuesta se suprime en ausencia de suero o después de co-tratamiento con NVP-AEW541 (0,5 μ M).
- 20 La **Figura 17** es un gráfico de barras que muestra la supervivencia de células MM primarias, células estromales de la médula ósea y células B periféricas después de exposición a NVP-AEW541 (0,5 μ M).
- La **Figura 18** es un gráfico de barras que muestra la tasa de supervivencia de células MM en presencia de Dexametasona (0,1 μ M) o NVP-AEW541 (250 nM), solos o en combinación.
- 25 La **Figura 19** es un gráfico de barras que muestra la tasa de supervivencia de células MM en presencia de Doxorrubicina a 50 ng/mL o NVP-AEW541 (250 nM), solos o en combinación.
- La **Figura 20** es un gráfico de barras que muestra la tasa de supervivencia de células MM en presencia de Melfalán (1 μ M) o NVP-AEW541 (250 nM), solos o en combinación.
- La **Figura 21** es un gráfico de barras que muestra la viabilidad de células MM en presencia de Bortezomib (5 nM) o NVP-AEW541 (250 nM), solos o en combinación.
- 30 La **Figura 22** es un gráfico de barras que muestra el efecto de NVP-AEW541 (0,5 μ M) en la actividad quimiotriptica del proteasoma en presencia o ausencia de suero.
- La **Figura 23** es un gráfico de barras que muestra el efecto de NVP-AEW541 (0,5 μ M) en la actividad de unión al ADN de NF κ B en presencia o ausencia de IGF-1.
- 35 La **Figura 24** es un gráfico de barras que muestra el efecto de NVP-AEW541 (0,5 μ M) en la actividad de unión al ADN de HIF-1 α en presencia o ausencia de IGF-1.
- La **Figura 25** es un gráfico de barras que muestra la inhibición de la fosforilación de IGF-1R en células MM por NVP-AEW541.
- La **Figura 26** es un gráfico de barras que muestra la inhibición de la fosforilación de Akt en células MM por NVP-AEW541.
- 40 La **Figura 27** es un gráfico de líneas que muestra el efecto de NVP-AEW541 en un modelo ortotópico de mieloma múltiple. Se dividieron ratones con enfermedad MM1S-LucNeo establecida en los huesos en grupos de tratamiento (n=8 por grupo) que recibieron bien NVP-AEW541 a 50 mg/kg PO BID o vehículo control. La carga tumoral se evaluó mediante la formación de imágenes *in vivo* semanalmente. Para cada animal, la carga tumoral se expresa respecto a la línea base (día 1 de tratamiento) y los datos se expresan como media \pm SD. Después de 15 días de tratamiento, p=0,04
- 45 por el ensayo de la t de student.

La **Figura 28** es un gráfico de líneas que muestra el efecto de AEW541 en el crecimiento de células de cáncer de mama.

La **Figura 29** es un gráfico de líneas que muestra el efecto de AEW541 en combinación con AMD3100 en el crecimiento de células tumorales.

La **Figura 30** es un esquema que ilustra la estructura y fórmula química de ADW742 y NVP-AEW541.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se basa en el descubrimiento de que los inhibidores del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1R) tienen actividad anti-tumoral frente a diversos tipos de células tumorales *in vitro*, incluso en células que son altamente resistentes a las terapias convencionales u otras terapias dirigidas.

Los factores de crecimiento semejantes a la insulina 1 (IGF-1) y 2 (IGF-2) se han implicado en la patofisiología de un amplio rango de neoplasias humanas debido a las propiedades mitogénicas y anti-apoptóticas mediadas por su receptor de tipo I (IGF-1R o CD221). La expresión de IGF-1R funcional se requiere para la transformación neoplásica en diversos modelos de tumorigénesis. Hasta ahora, sin embargo, la inhibición de la ruta de IGF-1R no se había aplicado con éxito como una estrategia terapéutica anti-cancerosa principal. Esto se ha debido no sólo a la ausencia de moléculas pequeñas inhibitoras de la función de IGF-1R clínicamente aplicables, sino también al hecho de que no se había dilucidado completamente el impacto relativo de inhibir la ruta de IGF/IGF-1R, comparado con otras cascadas de citoquina/factor de crecimiento, en la proliferación y supervivencia de las células tumorales. Además, La inhibición de IGF-1R como una estrategia para tratar el cáncer se complica por el hecho de que el receptor de la insulina (IR) es altamente homólogo a IGF-1R y la mayor parte de los inhibidores sólo presentan una pequeña diferenciación entre los dos receptores. La presente invención soluciona esta deficiencia en la técnica demostrando la utilidad del direccionamiento terapéutico de la función de IGF-1R en la terapia del cáncer y demostrando estrategias específicas para potenciar la ventana terapéutica de la inhibición de IGF-1R.

Los análisis transcripcionales y proteómicos exhaustivos indican que la inhibición de IGF-1R confiere una constelación pleiotrópica de secuelas moleculares anti-proliferativas y pro-apoptóticas, que proporcionan una explicación mecanística para la capacidad de los inhibidores de IGF-1R de sensibilizar a las células tumorales a otros fármacos anti-cancerosos. La inhibición de IGF-1R también dirige la respuesta de las células tumorales a otros factores de crecimiento, soluciona el fenotipo resistente a fármacos conferido por el microentorno óseo, y suprime la producción de citoquinas pro-angiogénicas. En un modelo de ratón clínicamente relevante de MM difuso, la administración sistémica del inhibidor selectivo de tirosina quinasa de IGF-1R ADW-742 o NVP-AEW541 suprime el crecimiento tumoral, prolonga la supervivencia, y potencia el efecto anti-tumoral de la quimioterapia citotóxica. Estos resultados proporcionan la base fundamental para el desarrollo de estrategias terapéuticas clínicas dirigidas a IGF-1R.

En la presente memoria se demuestra que los IGF en el suero constituyen promotores críticos de la proliferación, supervivencia y resistencia a fármacos de las células tumorales en múltiples neoplasias y que la inhibición de IGF-1R suprime significativamente estos efectos. Además se demuestra la eficacia *in vivo* de la administración sistémica de una o más moléculas pequeñas inhibitoras de la quinasa de IGF-1R, lo que muestra que la inhibición selectiva de IGF-1R consigue una actividad anti-tumoral *in vivo* con una ventana terapéutica favorable.

De acuerdo con esto, la invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento de las células tumorales usando inhibidores de IGF-1R en combinación con otras terapias y dicha combinación soluciona la limitación previa del único uso de los inhibidores de IGF-1R. Estos métodos son aplicables a todas las terapias dirigidas a IGF-1R.

La inhibición del crecimiento de las células tumorales se pretende que incluya una disminución del número de células tumorales que entran en el ciclo celular, muerte de las células tumorales o la disminución de la metástasis de las células tumorales. El tumor es un tumor sólido. Alternativamente, el tumor es un tumor hematológico. Los tumores adecuados para tratamiento con los métodos de la invención incluyen, pero no están limitados a, carcinomas, sarcomas, adenocarcinomas, linfomas, leucemias o mieloma múltiple (MM). Por ejemplo, los métodos de la invención son útiles para tratar cáncer óseo, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer adrenal, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, retinoblastoma.

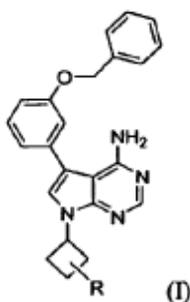
En varios aspectos, la presente descripción incluye la administración a un sujeto de un compuesto que inhibe la expresión o actividad de IGF-1R (referido en la presente memoria como inhibidores de IGF-1R). Una disminución de la expresión o actividad de IGF-1R se define como una disminución del número de moléculas de IGF-1R producido por la célula o una disminución de la actividad tirosina quinasa de la molécula de IGF-1R, respectivamente. Por ejemplo, la actividad de un IGF-1R se mide por la detección de la fosforilación de tirosina. El compuesto es por ejemplo; (i) moléculas pequeñas tales como moléculas pequeñas inhibitoras de quinasa (por ejemplo, inhibidores de tirosina

ES 2 368 741 T3

quinasa de IGF-1R) (ii) anticuerpos neutralizantes anti-IGF1R (por ejemplo, anti-IR3 o JB-1), o (iii) antagonistas del receptor IGF-1R.

5 Las moléculas pequeñas inhibitoras de quinasa incluyen derivados de 4-amino-5-fenil-7-ciclobutil-pirrolo[2,3-d] pirimidina tales como ADW-742, NVP-AEW541 (también referido en la presente memoria como AEW541) o análogos o isómeros de éstos.

Los inhibidores ejemplares de IGF-1R incluyen inhibidores de tirosina quinasa de IGF-1R y compuestos que tienen la Fórmula I.



en la que

10 R es un alquilo inferior sustituido con hidroxilo, amino no sustituido, mono o disustituido o con un radical heterocíclico; un radical $R_1-(C=Y)-Z-$, en el que R_1 es alquilo inferior no sustituido o sustituido, amino no sustituido, mono o disustituido, un radical heterocíclico, o hidroxilo libre o eterificado, Y es oxígeno, azufre o imino, y Z o no está presente o es alquilo inferior o amino-alquilo inferior; o un radical R_2 -sulfonilamino-alquilo inferior, en el que R_2 es alquilo inferior no sustituido o sustituido, amino no sustituido, mono o disustituido o fenilo sustituido opcionalmente con alquilo inferior, alcoxi inferior o nitro.

15 Los términos generales usados anteriormente en la presente memoria y posteriormente en la presente memoria tienen, en el contexto de esta descripción, los significados siguientes, a no ser que se indique otra cosa. Cuando se mencionan los compuestos de la fórmula I, se pretende que esto también incluya a los tautómeros y N-óxidos de los compuestos de fórmula I. Cuando se usa la forma plural para los compuestos, sales y semejantes, se pretende que esto signifique también un único compuesto, sal o semejante.

20 Los átomos de carbono asimétricos de un compuesto de fórmula I que están presentes opcionalmente pueden existir en la configuración (R), (S) o (R,S), preferiblemente en la configuración (R) o (S). Los sustituyentes en un doble enlace o un anillo pueden estar presentes en la forma cis (=Z-) o trans (=E-). Los compuestos pueden estar así presentes como mezclas de isómeros o como isómeros puros, preferiblemente como diastereómeros enantiopuros.

25 El término "inferior" indica un radical que tiene hasta e incluyendo un máximo de 7, especialmente hasta e incluyendo un máximo de 4 átomos de carbono, siendo los radicales en cuestión no ramificados o ramificados con ramificación única o múltiple.

30 Alquilo inferior es por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo o n-heptilo. Cuando R es alquilo inferior sustituido con amino no sustituido, mono o disustituido o con un radical heterocíclico, el alquilo inferior es preferiblemente metilo. El alquilo inferior R es preferiblemente metilo, isopropilo o terc-butilo.

35 El alquilo inferior sustituido es alquilo inferior como se ha definido anteriormente en el que pueden estar presentes uno o más sustituyentes, preferiblemente uno, tales como amino, N-alquilamino inferior, N,N-di-alquilamino inferior, N-alcanoilamino inferior, N,N-di-alcanoilamino inferior, hidroxilo, alcoxi inferior, alcoxi-inferior-alcoxi inferior, alcanoilo inferior, alcanoiloxi inferior, ciano, nitro, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, carbamoilo, amidino, guanidino, ureido, mercapto, alquiltio inferior, halógeno o un radical heterocíclico. El alquilo inferior R sustituido es preferiblemente alquilo inferior sustituido con alcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior o lo más preferiblemente con un radical heterocíclico.

El halógeno es principalmente flúor, cloro, bromo o yodo, especialmente flúor, cloro o bromo.

40 El amino mono o disustituido es amino sustituido con uno o dos radicales seleccionados independientemente uno del otro, por ejemplo, de alquilo inferior no sustituido o sustituido; fenilo o fenil-alquilo inferior en el que el radical fenilo está

ES 2 368 741 T3

sustituido opcionalmente, por ejemplo, con alquilo inferior no sustituido o sustituido, amino, N-alquilamino inferior, N,N-di-alquilamino inferior, N-alcanoilamino inferior, N,N-di-alcanoilamino inferior, hidroxilo, alcoxi inferior, alcoxi-inferior-alcoxi inferior, alcanoilo inferior, alcanoiloxi inferior, ciano, nitro, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, carbamoilo, amidino, guanidino, ureido, mercapto, alquiltio inferior o halógeno; adamantilo; y un radical heterocíclico.

- 5 Cuando R es alquilo inferior sustituido con amino mono o disustituido, amino mono o disustituido representa preferiblemente N-alquilamino inferior o N,N-di-alquilamino inferior, respectivamente.

R amino mono o disustituido es preferiblemente N-alquilamino inferior o N,N-di-alquilamino inferior, respectivamente, en el que el resto alquilo inferior está sustituido opcionalmente con fenilo, alquilo inferior-fenilo, alcoxi inferior-fenilo, morfolinilo o N,N-di-alquilamino inferior.

- 10 Un radical heterocíclico contiene especialmente hasta 20 átomos de carbono y es preferiblemente un radical monocíclico saturado o insaturado que tiene de 4 a 8 miembros en el anillo y de 1 a 3 heteroátomos que se seleccionan preferiblemente de nitrógeno, oxígeno y azufre, o un radical bi o tricíclico en el que, por ejemplo, uno o dos radicales benceno están conjugados (fusionados) con el radical monocíclico mencionado. Se prefiere por encima de todo que el radical heterocíclico contenga al menos un átomo de nitrógeno en el anillo, mediante lo cual la unión del radical heterocíclico al radical de la molécula de fórmula I ocurre a través del átomo de nitrógeno del anillo. El radical heterocíclico está sustituido opcionalmente con uno o más, preferiblemente con uno o dos, radicales tales como por ejemplo, alquilo inferior no sustituido o sustituido, amino, N-alquilamino inferior, N,N-di-alquilamino inferior, N-alcanoilamino inferior, N,N-di-alcanoilamino inferior, hidroxilo, alcoxi inferior, alcoxi-inferior-alcoxi inferior, alcanoilo inferior, alcanoiloxi inferior, ciano, nitro, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, carbamoilo, amidino, guanidino, ureido, mercapto, alquiltio inferior, halógeno, fenilo o piridilo. Lo más preferiblemente, un radical heterocíclico es azetidino, pirrolidinilo, piperidilo, azepanilo, piperacino, tetrahidropirano, morfolinilo o tiomorfolinilo, en el que dichos radicales están sustituidos opcionalmente con uno o más, preferiblemente uno o dos, radicales seleccionados independientemente uno del otro del grupo que consiste en alquilo inferior, hidroxilo-alquilo inferior, hidroxilo libre o eterificado, alcoxycarbonilo inferior, carbamoilo, fenilo y piridilo y la unión del radical heterocíclico al radical de la molécula de fórmula I ocurre a través del átomo de nitrógeno del anillo.

25 Cuando R es alquilo inferior sustituido con un radical heterocíclico, el radical heterocíclico representa preferiblemente azetidino, pirrolidinilo, di-alquilo inferior-pirrolidinilo, aminocarbonil-pirrolidinilo, piperidilo, hidroxil-piperidilo, aminocarbonil-piperidilo, azepanilo, alquilo inferior-piperacino, alcoxycarbonil inferior-piperacino, fenil-piperacino, piridil-piperacino, morfolinilo, di-alquilo inferior-morfolinilo o tiomorfolinilo.

- 30 Cuando R es alquilo inferior sustituido con un radical heterocíclico, el radical heterocíclico representa preferiblemente piperidilo, alquilo inferior-piperacino o morfolinilo.

Un radical heterocíclico R₁ es preferiblemente pirrolidinilo, piperidilo, alquilo inferior-piperacino o morfolinilo.

- 35 Las sales son especialmente sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I (o un N-óxido de éste). Dichas sales se forman, por ejemplo, como sales de adición a ácidos, preferiblemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, de los compuestos de fórmula I (o un N-óxido de éste) con un átomo de nitrógeno básico, especialmente las sales farmacéuticamente aceptables. En presencia de radicales cargados negativamente, tales como carboxi o sulfato, las sales también pueden formarse con bases, por ejemplo, sales metálicas o de amonio, tales como sales de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos, o sales de amonio con amoniaco o aminas orgánicas adecuadas, tales como monoaminas terciarias. En presencia de un grupo básico y un grupo ácido en la misma molécula, un compuesto de fórmula I (o un N-óxido de éste) también puede formar sales internas. Para propósitos de aislamiento y purificación también es posible usar las sales farmacéuticamente inaceptables, por ejemplo picratos o percloratos. Sólo las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos libres (si surge la ocasión, en la forma de composiciones farmacéuticas) logran uso terapéutico y por lo tanto se prefieren éstas.

- 45 Moléculas pequeñas inhibitorias adicionales incluyen trifostina y otras moléculas pequeñas descritas por Blum et al (Biochemistry 2000, 39, 157050-15712).

Los inhibidores del receptor de IGF1 preferidos para usarse según la presente invención son los descritos en WO 02/092599 e incluyen en particular los compuestos siguientes o sales de éstos.

- 50 cis-7-(3-aminometil-ciclobutil)-5-(3-benciloxi-fenil)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; trans-7-(3-aminometil-ciclobutil)-5-(3-benciloxi-fenil)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; dimetilamida del ácido cis-3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrololo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutanocarboxílico; dimetilamida del ácido trans-3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrololo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutanocarboxílico; metilamida del ácido cis-3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrololo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutanocarboxílico; metilamida del ácido trans-3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrololo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutanocarboxílico; cis-5-(3-benciloxi-fenil)-7-(3-dimetilaminometil-ciclobutil)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; trans-5-

piperacina-1-carboxílico; cis-5-(3-benciloxi-fenil)-7-[3-(4-fenil-piperacina-1-ilmetil)-ciclobutil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; cis-5-(3-benciloxi-fenil)-7-[3-(4-metil-piperacina-1-ilmetil)-ciclobutil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; cis-5-(3-benciloxi-fenil)-7-(3-tiomorfolin-4-ilmetil-ciclobutil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; cis-5-(3-benciloxi-fenil)-7-[3-(2,6-dimetil-morfolin-4-ilmetil)-ciclobutil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; amida del ácido cis-(R)-1-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-pirrolidina-2-carboxílico; amida del ácido cis-1-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-piperidina-3-carboxílico; trans-N-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-2-etoxi-acetamida; trans-N-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-2-(2-metoxi-etoxi)-acetamida; trans-1-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-3-metil-urea; cis-1-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-3-metil-urea; {3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-amida del ácido trans-pirrolidina-1-carboxílico; {3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-amida del ácido trans-piperidina-1-carboxílico; {3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-amida del ácido trans-morfolina-4-carboxílico; trans-3-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-1,1-dimetil-urea; {3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-amida del ácido trans-4-metil-piperacina-1-carboxílico; trans-3-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-1,1-dietil-urea; éster 2-dietilamino-etílico del ácido trans-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-carbámico; éster 2-morfolin-4-il-etílico del ácido trans-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-carbámico; éster 2-(4-metil-piperacina-1-il)-etílico del ácido trans-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-carbámico; éster 2-dimetilamino-etílico del ácido trans-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-carbámico; éster etílico del ácido trans-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-carbámico; éster etílico del ácido trans-4-{3-[4-amino-5-(3-benciloxi-fenil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-piperacina-1-carboxílico; cis-5-(3-benciloxi-fenil)-7-(3-pirrolidin-1-ilmetil-ciclobutil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; cis-7-(3-azetidina-1-ilmetil-ciclobutil)-5-(3-benciloxi-fenil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; éster metílico del ácido trans-3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-bromo-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutanocarboxílico; éster metílico del ácido trans-3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-metil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutanocarboxílico; trans-{3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-metil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutil}-metanol; éster metílico del ácido cis-3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-bromo-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutanocarboxílico; éster metílico del ácido cis-3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-metil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutanocarboxílico; cis-{3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-metil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutil}-metanol; éster metílico del ácido cis-3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-etil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutanocarboxílico; éster metílico del ácido trans-3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-etil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutanocarboxílico; cis-{3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-etil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutil}-metanol; trans-{3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-etil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutil}-metanol; trans-5-(3-Benciloxi-fenil)-6-metil-7-(3-pirrolidin-1-ilmetil-ciclobutil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; trans-5-(3-Benciloxi-fenil)-6-metil-7-[3-(4-metil-piperacina-1-ilmetil)-ciclobutil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; trans-1-{3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-metil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-piperidina-4-ol; trans-7-(Azetidina-1-ilmetil-ciclobutil)-5-(3-benciloxi-fenil)-6-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; trans-5-(3-Benciloxi-fenil)-6-metil-7-{3-[(tetrahidro-piran-4-ilamino)-metil]-ciclobutil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; trans-((R)-1-{3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-metil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-pirrolidin-2-il)-metanol; cis-5-(3-Benciloxi-fenil)-6-metil-7-(3-pirrolidin-1-ilmetil-ciclobutil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; cis-5-(3-Benciloxi-fenil)-6-metil-7-[3-(4-metil-piperacina-1-ilmetil)-ciclobutil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; cis-7-(3-Azetidina-1-ilmetil-ciclobutil)-5-(3-benciloxi-fenil)-6-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; cis-1-{3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-metil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-piperidina-4-ol; cis-((R)-1-{3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-metil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-pirrolidin-2-il)-metanol; cis-5-(3-Benciloxi-fenil)-6-etil-7-(3-pirrolidin-1-ilmetil-ciclobutil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; cis-5-(3-Benciloxi-fenil)-6-etil-7-[3-(4-metil-piperacina-1-ilmetil)-ciclobutil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; cis-7-(3-Azetidina-1-ilmetil-ciclobutil)-6-etil-5-{3-[(Z)-2-et-(E)-iliden-hexa-3,5-dieniloxi]-fenil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina; cis-1-{3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-etil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-piperidina-4-ol; cis-((R)-1-{3-[4-Amino-5-(3-benciloxi-fenil)-6-etil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-ciclobutilmetil}-pirrolidin-2-il)-metanol; y cis-5-(3-Benciloxi-fenil)-6-etil-7-{3-[(tetrahidro-piran-4-ilamino)-metil]-ciclobutil}-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina. Entre estos compuestos el que más se prefiere especialmente es trans-5-(3-benciloxi-fenil)-7-(3-pirrolidin-1-ilmetil-ciclobutil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina (ADW-742). La preparación de estos compuestos se describe en WO 02/092599.

El sujeto es un mamífero tal como un ser humano, un primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo, cerdo. El sujeto padece o presenta riesgo de desarrollar un tumor.

MÉTODOS PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO TUMORAL

Inhibición de IGF-1R en combinación con terapia citotóxica o quimioterapéutica

El crecimiento de las células tumorales se inhibe por la administración a un sujeto de un agente citotóxico o quimioterapéutico y una composición que contiene un inhibidor de IGF-1R. El inhibidor de IGF-1R se administra después del agente citotóxico o del agente quimioterapéutico. Alternativamente, el inhibidor de IGF-1R se administra antes del agente citotóxico o del agente quimioterapéutico. El inhibidor de IGF-1R se administra en una semana después del

ES 2 368 741 T3

agente citotóxico o del agente quimioterapéutico. Por ejemplo, el inhibidor de IGF-1R se administra menos de 72, 48, 24 ó 12 horas después del agente citotóxico o el agente quimioterapéutico. Preferiblemente, el inhibidor de IGF-1R se administra en las 3-12 horas posteriores al agente citotóxico o agente quimioterapéutico. Opcionalmente el inhibidor de IGF-1R se administra simultáneamente con el agente citotóxico o el agente quimioterapéutico.

- 5 La administración del inhibidor de IGF-1R es en una única dosis. Alternativamente, la administración es en múltiples dosis, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5 o más dosis. Opcionalmente, el inhibidor se administra durante un periodo de tiempo preseleccionado. Por ejemplo, el inhibidor se administra durante aproximadamente 1-2 días.

Un agente citotóxico es cualquier agente que es dañino para la estructura y función celulares, y que puede causar finalmente la muerte celular. Por ejemplo, un agente citotóxico es un agente quimioterapéutico o terapia de radiación. Un agente quimioterapéutico es cualquier agente que se usa para tratar cáncer. Un agente quimioterapéutico incluye agentes alquilantes (por ejemplo, clorambucilo, ciclofosfamida, tiotepa y busulfán); agentes anti-metabolito (por ejemplo, antagonistas de purina, antagonistas de pirimidina y antagonistas de folato); inhibidor mitótico tal como alcaloides de plantas (por ejemplo, actinomicina D, doxorubicina, mitomicina, paclitaxel, docetaxel, etopósido (VP-16), vinblastina, vincristina y vinorelbina); antibióticos anti-tumorales (por ejemplo, bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina (Adriamicina), idarrubicina y mitoxantrona); inhibidores de proteasoma (por ejemplo, bortezomib), hormonas corticosteroides (por ejemplo, prednisona y dexametasona); hormonas sexuales (por ejemplo, anti-estrógenos (tamoxifeno, fulvestrant), inhibidores de aromatasa (anastrozol, letrozol), progestinas (acetato de megestrol), anti-andrógenos (bicalutamida, flutamida) y agonistas de LHRH (leuprolida, goserelina). Otros agentes quimioterapéuticos incluyen L-asparaginasa y tretinoína, ciclofosfamida o Citoxán (C) metotrexato (M), 5-fluorouracilo ó 5-FU (F), Adriamicina (A) y Taxol (T), prednisona 5-fluorouracilo, capecitabina, metotrexato, gemcitabina, citarabina (ara-C) y fludarabina.

La terapia citotóxica/quimioterapéutica se administra usando protocolos estándar para un tipo de tumor particular. Los protocolos estándar son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el agente citotóxico o quimioterapéutico se administra por vía oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intratecal. Pueden usarse dos o más métodos de administración al mismo tiempo en determinadas circunstancias.

El inhibidor de IGF-1R y los agentes citotóxicos/quimioterapéuticos se administran a dosis terapéuticas estándar. Alternativamente, el inhibidor de IGF-1R y los agentes citotóxicos/quimioterapéuticos se administran a dosis sub-terapéuticas. Por "dosis terapéuticas estándar" se quiere decir la dosis a la que se detecta un efecto terapéutico del compuesto cuando el compuesto particular se administra solo. Por ejemplo, una dosis terapéutica estándar de un inhibidor de IGF-1R es una dosis que puede conseguir potencialmente el beneficio clínico como un único agente y/o modula la homeostasis de glucosa lo que resulta, por ejemplo, en hiperglucemia, cetosis o glucosuria en el paciente al que se administra el inhibidor. De manera similar, un dosis terapéutica estándar de un compuesto citotóxico/quimioterapéutico es la dosis a la que el compuesto confiere un beneficio clínico. Un beneficio clínico es la paliación de uno o más síntomas del cáncer particular, tal como tamaño del tumor o metástasis.

35 Una "dosis sub-terapéutica" incluye las dosis a las que no se detecta un efecto terapéutico del compuesto cuando el compuesto particular se administra solo.

Opcionalmente, el inhibidor de IGF-1R se administra en una cantidad suficiente para causar alteraciones en el metabolismo de la glucosa, cuyas manifestaciones clínicas incluyen hiperglucemia, cetosis y glucosuria.

Potenciación de la inhibición de IGF-1R por la disminución de los niveles de IGF (no reivindicado)

40 En otro aspecto, el crecimiento tumoral se inhibe por la administración a un sujeto de un inhibidor de IGF-1R en combinación con un compuesto que disminuye la concentración de los IGF, por ejemplo, IGF-1 o IGF-2. Los IGF son producidos por muchos tipos diferentes de tejidos tales como hígado, médula ósea o el tumor. La mayor parte del IGF-1 en el suero es producido por el hígado y es dependiente de la hormona del crecimiento.

45 El compuesto disminuye la concentración de IGF sistémicamente (es decir, concentración en el suero). Alternativamente, la concentración de IGF se disminuye localmente (es decir, microentorno específico del tumor). Mediante la disminución de la concentración sistémica o local de ligandos del IGF-1R, se potencia la inhibición del IGF-1R, disminuyendo así la cantidad de inhibidor de IGF-1R requerida, disminuyendo a su vez los efectos secundarios asociados con la inhibición de IGF-1R.

50 La medida de los niveles de IGF, por ejemplo, en el suero o el microentorno del tumor, se consigue con ensayos conocidos para el experto en la técnica, incluyendo radioinmunoensayos (RIA), ELISA, RT-PCR, localización inmunohistoquímica de IGF-1 en el tejido (por ejemplo, material de biopsia).

ES 2 368 741 T3

La reducción de los niveles de IGF en un sujeto se realiza por métodos conocidos en la técnica, incluyendo la administración de moléculas pequeñas y la inhibición de la transcripción y/o traducción de IGF. Por ejemplo, los niveles de IGF-1 se reducen con somatostatina y análogos de ésta, con inhibidores de la producción de la hormona del crecimiento, con agentes que disminuyen la biodisponibilidad de la hormona del crecimiento, con inhibidores del receptor de la hormona del crecimiento y/o con inhibidores de las cascadas de señalización aguas abajo del receptor de la hormona del crecimiento. Los análogos de somatostatina incluyen octreotido (SMS 201-995), lanreotido, depreotido, vapreotido (RC-160), somatulina (BIM 23014), TT-232, AN-238. Otros análogos de somatostatina adecuados son los descritos en la Patente U.S. 6.465.613 cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia. Los inhibidores de la producción de la hormona del crecimiento incluyen oligodesoxinucleótidos antisentido (ODN) o ARN pequeños inhibidores (siARN) frente al transcrito de ARNm de la molécula de la hormona del crecimiento. Los agentes que disminuyen la biodisponibilidad de la hormona del crecimiento incluyen anticuerpos neutralizantes frente a la hormona del crecimiento, receptores solubles de la hormona del crecimiento u otras proteínas que pueden prepararse por ingeniería para unirse a la hormona del crecimiento con una afinidad mayor que su receptor en tejidos diana. Los inhibidores del receptor de la hormona del crecimiento incluyen anticuerpos neutralizantes, péptidos inhibidores o moléculas pequeñas inhibitoras que evitan que la hormona del crecimiento se una a su receptor y/o que active sus rutas de señalización aguas abajo en tejidos diana. Los inhibidores de la cascada de señalización aguas abajo del receptor de la hormona del crecimiento incluyen ODN antisentido, construcciones de siARN, péptidos, moléculas pequeñas inhibitoras u otras estrategias que pueden bloquear las rutas de señalización que son estimuladas por el receptor de la hormona del crecimiento y que pueden dar lugar a una producción incrementada de los IGF.

La transcripción de IGF-1 se inhibe, por ejemplo, tomando como diana secuencias nucleotídicas complementarias a la región reguladora del ácido nucleico de IGF-1 (por ejemplo, el promotor y/o potenciadores de IGF-1) para formar estructuras de triple hélice que evitan la transcripción del gen de IGF-1 en células diana. Véase, por ejemplo, Helene, 1991. *Anticancer Drug Des.* 6: 569-84; Helene, *et al.* 1992. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660: 27-36; Maher, 1992. *Bioassays* 14: 807-15 (cuyos contenidos se incorporan por referencia en su totalidad).

Alternativamente, se inhibe la traducción de IGF con un ácido nucleico antisentido, tal como una ribozima. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un ARNm, con los que tienen una región complementaria. Así, las ribozimas (por ejemplo, ribozimas "cabeza de martillo" como se describe en Haselhoff y Gerlach 1988. *Nature* 334: 585-591) pueden usarse para escindir catalíticamente los transcritos de ARNm de IGF-1 para inhibir de esta manera la traducción del ARNm de IGF-1. Puede diseñarse una ribozima que tiene especificidad por un ácido nucleico que codifica IGF-1 tomando como base la secuencia nucleotídica de un ADNc de IGF-1. Por ejemplo, puede construirse un derivado de un ARN de *Tetrahymena* L-19 IVS en el que la secuencia nucleotídica del sitio activo es complementaria con la secuencia nucleotídica que se quiere escindir en un ARNm que codifica IGF-1. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. 4.987.071 de Cech, *et al.*, y la Patente U.S. 5.116.742 de Cech, *et al.* El ARNm de IGF-1 también puede usarse para seleccionar un ARN catalítico que tenga una actividad ribonucleasa específica a partir de un conjunto de moléculas de ARN. Véase, por ejemplo, Bartel *et al.*, (1993) *Science* 261: 1411-1418.

Los ácidos nucleicos que codifican IGF ejemplares incluyen por ejemplo IGF-1 humano disponible como Nos. de Registro de GENBANK™ AY790940; CR541861; X05113; AY260957; o EO2872 o IGF-2 humano disponible como Nos. de Registro de GENBANK™ S62621; T29467; T27620; L15440; AH002704; M22373; o M22372.

El orden de administración del inhibidor de IGF-1R y el compuesto que disminuye la concentración de IGF, y la duración de la administración, determinará la eficacia del tratamiento anti-tumoral. En algunos aspectos de la invención, es ventajoso administrar un inhibidor de IGF-1R y un compuesto que disminuye la concentración de IGF simultáneamente. Alternativamente, en otros aspectos de la invención, es ventajoso administrar el inhibidor de IGF-1R después del compuesto que disminuye la concentración de IGF es decir, 3-12 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o aproximadamente 48 horas después de la administración del compuesto que disminuye la concentración de IGF.

Inhibición de IGF-1R en combinación con terapia anti-diabética (no reivindicado)

La administración de compuestos que inhiben IGF-1R también puede inhibir potencialmente el receptor de la insulina, lo que resulta en una homeostasis aberrante de la glucosa, hiperglucemia y diabetes. La eficacia incrementada de la inhibición de la actividad de IGF-1R puede conseguirse evitando o reduciendo las complicaciones diabéticas. De acuerdo con esto, en otro aspecto de la invención, el crecimiento tumoral se inhibe por la administración a un sujeto de un inhibidor de IGF-1R en combinación con un agente anti-diabético.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "agente anti-diabético" incluye cualquier agente que, cuando se proporciona en una dosis eficaz, reduce, inhibe o previene uno o más síntomas clínicamente relevantes de la diabetes. Los síntomas de la diabetes incluyen homeostasis aberrante de la glucosa, sed y micción incrementadas, pérdida de

peso, pérdida de músculo, visión borrosa, hambre, fatiga, infecciones frecuentes, adormecimiento u hormigueo en las manos y pies, piel seca, dolor de cabeza, cicatrización lenta de las heridas.

5 Los agentes anti-diabéticos incluyen pero no están limitados a: (i) insulina administrada exógenamente; (ii) agentes que potencian la sensibilidad a la insulina (por ejemplo, tiazolidindionas (por ejemplo, rosiglitazona (AVANDIA[®]), pioglitazona (ACTOS[®]), troglitazona y ciglitazona); y biguanidas (por ejemplo, metformina (GLUCOPHAGE[®]; GLUCOPHAGE[®] XR)); (iii) agentes que potencian la secreción de insulina (secretagogos de insulina; por ejemplo, sulfonilureas, tales como gliclazida, tolbutamida, glimepirida, glibenclamida, tolazamida, y repaglinida; meglitinidas; imidazolininas tales como efaxorán; y secretagogos de la insulina de acción rápida (por ejemplo, nateglinida y repaglinida); e inhibidores de la alfa-glucosidasa (por ejemplo, acarbosa (PRECOSE), miglitol (GLYSET)).

10 El agente anti-diabético se administra simultáneamente, antes o después de la administración del inhibidor de IGF-1R. Opcionalmente, el agente anti-diabético se administra durante un periodo de tiempo pre-seleccionado antes o después de la administración del inhibidor de IGF-1R. Alternativamente, el agente anti-diabético se administra cuando resulta evidente la aparición de intolerancia a la glucosa y se titula para mejorar los signos y síntomas de la hiperglucemia.

Potenciación de la inhibición de IGF-1R disminuyendo la expresión o actividad del IGF-1R (no reivindicado)

15 Los IGF (es decir, IGF-1 o IGF-2) median la proliferación y resistencia a la apoptosis de las células tumorales a través de la señalización de IGF-1R. La capacidad de repuesta de las células tumorales a los IGF se ve influida significativamente por la expresión de IGF-1R competentes para la señalización en la superficie de las células tumorales, de esta manera el crecimiento de las células tumorales se inhibe por interferencia con la expresión o actividad del IGF-1R en las células tumorales.

20 De acuerdo con esto, en otro aspecto de la invención, el crecimiento de las células tumorales se inhibe por la administración a un sujeto de una composición que incluye un compuesto que disminuye la expresión (es decir, en la superficie celular) o actividad del IGF-1R. Opcionalmente, la composición incluye además un inhibidor de IGF-1R.

25 La expresión o actividad de IGF-1R se disminuye por la supresión de la transcripción del gen de IGF-1R. La inhibición de la transcripción de IGF-1R se consigue, por ejemplo, tomando como diana secuencias nucleotídicas complementarias a la región reguladora del ácido nucleico de IGF-1 (por ejemplo, el promotor y/o potenciadores de IGF-1) para formar estructuras de triple hélice que evitan la transcripción del gen de IGF-1R en células diana. Véase, por ejemplo, Helene, 1991. *Anticancer Drug Des.* 6: 569-84; Helene, *et al.* 1992. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660: 27-36; Maher, 1992. *Bioassays* 14: 807-15. Alternativamente, la transcripción del gen de IGF-1R se disminuye por el incremento de la actividad de reguladores negativos del promotor del gen de IGF-1R.

30 La inhibición de la traducción de IGF-1R se consigue, por ejemplo, con un ácido nucleico antisentido de IGF-1R, un ARN pequeño de interferencia de IGF-1R o una ribozima específica de IGF-1R.

35 La expresión del gen de IGF-1R puede atenuarse por ARN de interferencia. Una estrategia muy conocida en la técnica es el silenciamiento de genes mediado por ARN pequeños de interferencia (siARN) en el que los productos de la expresión de un gen de IGF-1R son la diana de secuencias nucleotídicas de siARN bicatenarias específicas derivadas de IGF-1R que son complementarias al menos a un segmento con una longitud de 19-25 nt del transcrito del gen de IGF-1R, incluyendo la región 5' no traducida (UT), el ORF, o la región 3' UT. Véanse, por ejemplo, las solicitudes de PCT WO00/44895, WO99/32619, WO01/75164, WO01/92513, WO 01/29058, WO01/89304, WO02/16620 y WO02/29858, cada una incorporada por referencia en la presente memoria en su totalidad. Los genes diana son un gen de IGF-1R, o un modulador en 5' ó 3' respecto a un gen de IGF-1R. Los ejemplos no limitativos de moduladores 5' ó 3' de un gen de IGF-1R incluyen, por ejemplo, un factor de transcripción que se une al promotor del gen de IGF-1R, una quinasa o fosfatasa que interacciona con un polipéptido IGF-1R y polipéptidos implicados en una ruta de señalización de IGF-1R.

45 Las ribozimas se usan para escindir catalíticamente los transcritos de ARNm de IGF-1R para inhibir de esta manera la traducción del ARNm de IGF-1R. Se diseña una ribozima que tiene especificidad por un ácido nucleico que codifica IGF-1R tomando como base la secuencia nucleotídica de un ADNc de IGF-1R por métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, el ARNm de IGF-1R se usa para seleccionar un ARN catalítico que tiene actividad ribonucleasa específica a partir de un conjunto de moléculas de ARN. Véase, por ejemplo, Bartel *et al.*, (1993) *Science* 261: 1411-1418.

Los ácidos nucleicos que codifican IGFR ejemplares incluyen por ejemplo IGFR humanos disponibles como Nos. de Registro de GENBANK[™] NM000875, NM00876, NM04215 o AF064078.

50 Además, el compuesto que inhibe la expresión o actividad de IGF-1R incluye los compuestos que (i) inhiben el procesamiento proteolítico del precursor de IGF-1R; (ii) evitan el movimiento intracelular de IGF-1R recién sintetizado desde el retículo endoplásmico a la superficie celular; (iii) interfieren con la modificación covalente posterior a la

ES 2 368 741 T3

traducción (por ejemplo, glicosilación o conjugación lipídica) de la proteína IGF-1R; (iv) interrumpen la conformación tridimensional apropiada del IGF-1R; (v) evitan el acoplamiento de proteínas adaptadoras a los dominios intracelulares del IGF-1R; (vi) potencian la internalización, ubiquinación o degradación del IGF-1R.

MÉTODOS PARA REDUCIR LA ANGIOGÉNESIS

5 La angiogénesis se inhibe por la administración a tejidos de un inhibidor de IGF-1R. Los tejidos que se pueden tratar incluyen un tejido intestinal, un tejido cardíaco, un tejido pulmonar, un tejido dérmico o un tejido hepático. El tejido es un tejido tumoral.

La inhibición de la angiogénesis se caracteriza por una reducción de la formación de vasos sanguíneos en el tejido tratado comparado con un tejido que no se ha puesto en contacto con un IGF-1R. Los tejidos se ponen en contacto 10 directamente con un inhibidor. Alternativamente el inhibidor se administra sistémicamente. La angiogénesis se evalúa por métodos conocidos en la técnica tales como el ensayo en Matrigel.

MÉTODOS PARA MODULAR LA APOPTOSIS

En la invención también se incluyen métodos para inducir la apoptosis o para sensibilizar una célula frente a la 15 apoptosis. Por "inducir la apoptosis" se quiere decir que se inicia la muerte celular programada. La apoptosis se mide por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, la apoptosis se mide por tinción con anexina V.

En un aspecto, la apoptosis se consigue poniendo en contacto la célula con un inhibidor de IGF-1R. La célula es por ejemplo una célula tumoral. La población celular que se expone a, es decir, se pone en contacto con, un inhibidor de IGF-1R puede ser cualquiera de varias células, es decir, una o más células, y puede proporcionarse *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

20 Algunas afecciones patológicas están relacionadas con el desarrollo de una regulación a la baja defectuosa de la apoptosis en las células afectadas. Por ejemplo, las neoplasias resultan, al menos en parte, de un estado de resistencia a la apoptosis en el que las señales de proliferación celulares superan de manera inapropiada las señales de muerte celulares. Además, determinadas afecciones patológicas tales como afecciones linfoproliferativas, cáncer incluyendo 25 cáncer resistente a fármacos, artritis, inflamación, enfermedades autoinmunes y semejantes pueden resultar de una regulación a la baja de la regulación de la muerte celular. En dichas afecciones patológicas, sería deseable estimular los mecanismos apoptóticos.

Las células tumorales tienen una regulación al alza de los mecanismos anti-apoptóticos que las protegen de los inductores fisiológicos de la apoptosis así como de agentes terapéuticos que inducen la apoptosis, tales como agentes 30 citotóxicos y quimioterapéuticos. Los cambios pro-apoptóticos pleiotrópicos que resultan de la inhibición de la función de IGF-1R en una célula tumoral restauran la susceptibilidad a las señales apoptóticas.

ADMINISTRACIÓN TERAPÉUTICA

La invención incluye la administración a un sujeto de una composición que comprende un compuesto que disminuye la expresión o actividad de IGF-1R (referido en la presente memoria como un "inhibidor de IGF-1R" o "compuesto terapéutico").

35 Una cantidad eficaz de un compuesto terapéutico es preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg. Por ejemplo, se administran 1, 10, 25, 50, 75, 100, 125 mg/kg de un inhibidor de IGF-1R. Las dosis eficaces varían, como reconocen los expertos en la técnica, dependiendo de la ruta de administración, uso de excipientes, y coadministración con otros tratamientos terapéuticos (como se ha descrito anteriormente) incluyendo el uso de otros agentes anti-cancerosos o agentes terapéuticos para tratar, prevenir o aliviar un síntoma de un cáncer 40 particular. Un régimen terapéutico se lleva a cabo por la identificación de un mamífero, por ejemplo un paciente humano, que padece (o presenta riesgo de desarrollar) cáncer, usando métodos estándar.

El compuesto terapéutico (incluyendo otros tratamientos terapéuticos, por ejemplo, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos y agentes anti-diabéticos) se administra a dicho individuo usando métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, el compuesto se administra por vía oral, rectal, nasal, tópica o parenteral, por ejemplo, subcutánea, 45 intraperitoneal, intramuscular e intravenosa. El compuesto se formula opcionalmente como un componente de una mezcla de fármacos terapéuticos para tratar cáncer. Los ejemplos de formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen disoluciones acuosas del agente activo en una disolución salina isotónica, una disolución de glucosa al 5% u otro excipiente estándar farmacéuticamente aceptable. También se utilizan agentes de solubilización estándar tales como PVP o ciclodextrinas como excipientes farmacéuticos para la administración de los compuestos terapéuticos.

Los compuestos terapéuticos descritos en la presente memoria se formulan en composiciones para otras rutas de administración utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, el inhibidor de IGF-1R se formula en una cápsula o un comprimido para administración oral. Las cápsulas pueden contener cualquier material estándar farmacéuticamente aceptable tal como gelatina o celulosa. Los comprimidos pueden formularse según procedimientos convencionales mediante la compresión de mezclas de un compuesto terapéutico con un vehículo sólido y un lubricante. Los ejemplos de vehículos sólidos incluyen almidón y azúcar bentonita. El compuesto se administra en la forma de un comprimido de cubierta dura o una cápsula que contiene un aglutinante, por ejemplo, lactosa o manitol, un relleno convencional y un agente de comprimido. Otras formulaciones incluyen una pomada, supositorio, pasta, pulverizador, parche, crema, gel, esponja reabsorbible o espuma. Dichas formulaciones se producen usando métodos muy conocidos en la técnica.

- 5
- 10 Los compuestos inhibidores de IGF-1R son eficaces después del contacto directo del compuesto con el tejido afectado. De acuerdo con esto, el compuesto se administra por vía tópica. Por ejemplo, para tratar mieloma el compuesto se aplica en el área de la piel afectada. Alternativamente, los inhibidores de IGF-1R se administran sistémicamente. Además, los compuestos se administran por implante (bien directamente en el tumor o por vía subcutánea) de una matriz sólida o reabsorbible que libera lentamente el compuesto en los tejidos adyacentes y circundantes del sujeto.
- 15 Por ejemplo, para el tratamiento de cánceres gastrointestinales, el compuesto se administra sistémicamente o se administra localmente directamente en el tejido gástrico. El compuesto administrado sistémicamente se administra por vía intravenosa, rectal u oral. Para la administración local, una oblea o esponja reabsorbible impregnada con el compuesto se pone en contacto directo con el tejido gástrico. El compuesto o mezcla de compuestos se libera lentamente *in vivo* por difusión del fármaco desde la oblea y erosión de la matriz polimérica.

- 20 El cáncer de hígado se trata, por ejemplo, por infusión en la vasculatura hepática de una disolución que contiene el compuesto. Para el tratamiento de un cáncer del sistema neurológico, el compuesto se administra por vía intravenosa o intratecal (es decir, por infusión directa en el fluido cerebroespinal). Para la administración local, una oblea o esponja reabsorbible impregnada con el compuesto se pone en contacto directo con el tejido del SNC. El compuesto o mezcla de compuestos se libera lentamente *in vivo* por difusión del fármaco desde la oblea y erosión de la matriz polimérica.
- 25 Alternativamente, el compuesto se infunde en el cerebro o fluido cerebroespinal usando métodos conocidos. Por ejemplo, se pone un anillo de orificio de trépano con un catéter para usarse como un puerto de inyección para acoplar el cráneo en un orificio de trépano perforado en el cráneo. Se accede a un reservorio de fluido conectado al catéter por una aguja o estilete insertado a través de un septo situado por encima de la parte superior del anillo del orificio del trépano. Un ensamblaje de catéter (por ejemplo, un ensamblaje descrito en la Patente U.S. No. 5.954.687) proporciona un paso de flujo de fluido adecuado para la transferencia de fluidos a o desde una localización seleccionada en, cerca de o en el interior del cerebro para permitir la administración del fármaco durante un periodo de tiempo.
- 30

Los cánceres pulmonares se tratan, por ejemplo, por la administración del compuesto por inhalación. Los compuestos se administran en la forma de un pulverizador de aerosol desde un contenedor presurizado o dispensador que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

35 **EQUIVALENTES**

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de averiguar usando nada más que experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en la presente memoria. Los componentes, procesos y métodos apropiados de esas patentes, solicitudes y otros documentos pueden seleccionarse para la presente invención y realizaciones de ésta.

40 **EJEMPLOS**

La invención se ilustrará adicionalmente en los ejemplos siguientes no limitativos.

Ejemplo 1. Métodos Generales

Líneas celulares y especímenes tumorales primarios

- 45 Todas las líneas celulares estudiadas se listan en la Tabla 1. La línea parental sensible a dexametasona (Dex) MM-1S y su sublínea celular resistente a Dex MM-1R fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Steven Rosen (Northwestern University, Chicago, IL); la línea celular parental sensible a químicos MM RPMI-8226/S y sus sublíneas celulares resistentes a químicos RPMI-8226/Dox40 (resistente a doxorubicina), RPMI-8226/MR20 (resistente a mitoxantrona), RPMI-8226/LR5 (resistente a melfalán) fueron proporcionadas amablemente por el Dr. William Dalton (Lee Moffitt Cancer Center, Tampa, FL); las células OCI-My5 fueron proporcionadas por el Dr. Meissner (Universidad de Ontario, Toronto, Canadá); las células EJM, LP-1, KMM1, K620, OPM-1 y OPM-2 fueron proporcionadas por el Dr. Leif Bergsagel; las células INA-6 fueron proporcionadas por Renate Burger (Universidad de Erlanger-Nuemberg, Alemania); las células XG-1 se obtuvieron del Dr. Pierfrancesco Tassone (Universidad de Magna Grecia, Italia); las células NCI-H929 y U266 se
- 50

adquirieron en American Type Cell Culture (ATCC); las células MM-1S-myrAkt y MM-1S-Bcl-2 se establecieron por transfección estable de células MM-1S con construcciones que codifican la forma miristoilada constitutivamente activa de Akt y Bcl-2, respectivamente. MM-1S-TR13 es una sublínea resistente TRAIL/Apo2L establecida después de 13 ciclos sucesivos de tratamiento de las células parentales MM-1S sensibles TRAIL/Apo2L con la forma humana recombinante de TRAIL/Apo2L (N. Mitsiades, observación no publicada). Las células MM-SAR-1 se establecieron a partir de células tumorales MM primarias de un paciente resistente al inhibidor de proteasoma PS-341. También estudiamos las líneas celulares de linfoblastoide B ARH-77, IM-9, HS Sultan y las líneas celulares leucémicas REH y NALM-6 (adquiridas en ATCC), así como un panel de líneas celulares de linfoma humano, incluyendo las líneas celulares de linfoma de células B grandes difuso DHL-4, DHL-6, DHL-7, DHL-8 y DHL-10 (proporcionadas amablemente por la Dra. Margaret Shipp, Dana-Farber Cancer Institute Boston, MA), las líneas celulares de linfoma de Burkitt Namalwa y la línea celular de linfoma linfoplasmacítico (Macroglobulinemia de Waldenstrom) WM-WSU (regalo amable del Dr. Ayad Al-Katib, Wayne State University, Detroit Cancer Center). Todas las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con 10% suero fetal bovino tratado con dextrano 10% carbón (FBS; Hyclone, Logan, UT) así como L-glutamina, penicilina y estreptomina (Life Technologies), excepto las células INA-6 y XG-1 que se cultivaron en medio suplementado con 20% FBS y 2,5 ng/mL de IL-6 humana recombinante. Las células tumorales MM primarias de 35 pacientes con MM resistentes a quimioterapia convencional o de alta dosis, talidomida (y/o sus análogos inmunomoduladores), inhibidor del proteasoma PS-341 u otros agentes investigacionales se obtuvieron (después de un consentimiento informado) de muestras de aspirados de médula ósea (BM). Después de la lisis de las células rojas sanguíneas con 0,86% cloruro de amonio, las células MM se seleccionaron por selección positiva basada en separación inmunomagnética con mAb anti-CD138 humano conjugado con microlechos (MACS, Miltenyi, Biotech) o selección positiva basada en citometría de flujo con mAb anti-CD138 conjugado con ficoeritrina y como en estudios previos. La pureza (>95%) se evaluó tanto por morfología como por citometría de flujo (Becton-Dickinson FACSort, Franklin Lakes, NJ).

Las muestras de pacientes con MM primario se aislaron frescas de aspirados de médula ósea de pacientes sometidos a aspirados de médula ósea para diagnóstico o reestadiaje bajo un protocolo aprobado IRB. Las células MM se purificaron usando una mezcla RosetteSep personalizada de anticuerpos monoclonales (mAb) (StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canadá) para la selección negativa de células MM CD138⁺. La fracción CD138⁻ del proceso de purificación de células MM se cultivó en medio suplementado con 20% FBS para el aislamiento de las células estromales de la médula ósea adherentes. Las células B de sangre periférica se aislaron por centrifugación de densidad en ficoll de las muestras de sangre periférica de pacientes MM.

Anticuerpos y reactivos

PS-341 (bortezomib) fue proporcionado por Millennium Pharmaceuticals (Cambridge, MA). Los demás reactivos se obtuvieron como sigue: el anticuerpo monoclonal neutralizante anti-IGF-1R humano de ratón alR3 y Apo2L/TRAIL de Calbiochem; los anticuerpos monoclonales de ratón para Bcl-2, Bcl-X_L, A1/Bfl-1, FKHL-1 y sus formas fosforiladas, Bax, Raf, fosforilados y totales MEK1/2, IKK-a, Bcl-2, Bcl-X_L, GAPDH de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anticuerpo monoclonal para FLIP de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY); anticuerpo policlonal de conejo frente a RANKL de Chemicon; anticuerpos monoclonales frente a hsp90, Akt, fosfo-Akt, Bmx, IKK-a, Raf-1, RhoA, src y p70^{S6K} de Cell Signaling Technologies (Beverly, MA); IGF-1 e IL-6 recombinantes humanos y anticuerpo policlonal frente a cIAP-1, cIAP-2 y XIAP, así como anticuerpos monoclonales conjugados con PE frente a IGF-1R, IL-6R, CD138, CD38 y CD45RA o anticuerpos control mIgG1 (no conjugados o conjugados con FITC o PE) de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN); MTT, dexametasona, doxorubicina y melfalán de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO); el péptido antagonista JB-1 de Bachem Bioscience (King of Prussia, PA); el anticuerpo monoclonal anti-IGF-2R conjugado con PE de Novus Biologicals (Littleton, CO); el kit de permeabilización Fix&Perm para los análisis de citometría de flujo intracelular (Caltag Technologies); y el kit de Quimioluminiscencia Amplificada (ECL), que incluye los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo marcados con peroxidasa, de Amersham (Arlington Heights, IL).

Transfecciones y transducciones retrovirales

Las transfecciones estables de las células MM-1S con vectores que codifican Akt o Bcl-2 miristoilados (constitutivamente activos) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) o con vectores vacíos (neo), se realizaron usando medio de selección que contiene Lipofectamina 2000 (Life Technologies) y G418, como se ha descrito previamente. La transducción retroviral de las células MM-1S y MM-1R con un vector pGC-*gfp/luc* (regalo amable de C.G. Fathman, Universidad de Stanford) o pMMp-LucNeo se realizó como se ha descrito previamente.

Ensayos ex vivo de sensibilidad al fármaco

La supervivencia celular de las células tratadas con inhibidor de IGF-1R se examinó usando el ensayo colorimétrico del Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio (MTT). Las células se sembraron en placas de 48 pocillos a una confluencia de 70-80% (~50.000 células/mL, 200 µL por pocillo) y se incubaron durante 18 h con el tratamiento indicado.

ES 2 368 741 T3

Al final de cada tratamiento, las células se incubaron con 1 mg/ml de MTT durante 4 horas a 37°C; se añadió una mezcla de isopropanol y 1N HCl (23:2, v/v) con pipeteo vigoroso para disolver los cristales de formazán. Se midió la absorbancia del colorante (A) en las células viables a 570 nm, con 630 nm como longitud de onda de referencia. La supervivencia celular se estimó como un porcentaje del valor de los controles sin tratar. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces, y cada condición experimental se repitió al menos en pocillos en cuadruplicado en cada experimento.

Actividad anti-tumoral *in vivo* de la inhibición de IGF-1R

La actividad anti-MM *in vivo* de ADW-742 se evaluó en un modelo de lesiones esqueléticas difusas de células MM que expresan luciferasa en ratones SCID/NOD, monitorizados de manera seriada con formación de imágenes por bioluminiscencia de cuerpo completo, como se ha descrito previamente. Brevemente, los ratones macho (6 a 8 semanas de edad) SCID/NOD (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) se irradiaron subletalmente (300 rads) usando ¹³⁷Cs como fuente de irradiación γ . Después de 3-6 horas, 5×10^6 células MM-1S-luc⁺ en 100 μ L de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) se inyectaron a través de la vena de la cola en cada ratón. Los ratones se monitorizaron diariamente para cambios en su peso corporal, signos de infección y parálisis y semanalmente por formación de imágenes por bioluminiscencia de cuerpo completo utilizando el Sistema de Formación de Imágenes In Vivo (IVIS, Xenogen Corp, Alameda, CA) con un tiempo total de formación de imágenes de 2 min, bin 2. La bioluminiscencia corporal total se cuantificó integrando el flujo fotónico (fotones/seg) a través de una región estandarizada de interés que engloba a cada ratón (Living Images, Xenogen). ADW-742 (Novartis Pharma AG, Basilea, Suiza) se formuló en 25 mM ácido tartárico y se administró por inyección i.p. o por sonda oral. El melfalán (Alkeran, GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC) se formuló según las instrucciones del fabricante y se administró por inyección i.p. Todos los estudios con animales fueron aprobados por el Animal Care y Use Committee del Dana-Farber Cancer Institute.

Ensayos de citometría de flujo, inmunotransferencia y funcionales

Los análisis de citometría de flujo para IGF-1R y IGF-2R se realizaron como se ha descrito previamente en un citómetro de flujo EPICS-XL-MCL (Beckman Coulter). Se aplicaron protocolos descritos previamente para los análisis de inmunotransferencia; ensayo de actividad de telomerasa TRAP; ensayo de actividad quimiopéptica de proteasoma 20S; ELISA de actividad de unión al ADN para las evaluaciones cuantitativas de actividades transcripcionales NF- κ B y HIF-1 α . Los ELISA de VEGF e IGF-1 se realizaron según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Perfilado molecular de la inhibición de IGF-1R

El perfil de la expresión génica de las células MM tratadas con inhibidores de IGF-1R (ADW-742, α -IR3), en presencia o ausencia de suero se analizó usando micromatrices de oligonucleótidos U133A (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA) usando protocolos descritos previamente para la extracción y purificación de ARN total, síntesis de ADNc y ARNc biotinilados, hibridación con chips de U133A humano de Affymetrix y escaneo en ChipScanner HP para detectar las señales de hibridación. Los análisis posteriores de archivos resultantes de imágenes escaneadas se analizaron con el programa informático GeneChip Microarray Analysis Suite 5.0 de Affymetrix (Affymetrix), normalizados y analizados con algoritmos de agrupación jerárquica, agrupación funcional y redes de relevancia, como en estudios previos. Se realizó un análisis proteómico global de alto rendimiento del estado de señalización de las células MM tratadas con inhibidor de IGF-1R por matrices de inmunotransferencia múltiples usando las plataformas KPKS-1.0 y KPSS-1.0, como se ha descrito previamente (Mitsiades CS et al. Semin Oncol. 2003 Abr; 30(2): 156-160 y Mitsiades N et al. Blood. 2003 15 Mar; 101(6): 2377-80).

Análisis estadístico

La significancia estadística de los resultados de los ensayos *in vitro* se examinó por análisis de varianza de 2 vías, seguido de ensayo de Duncan a posteriori. La significancia estadística de los estudios de formación de imágenes por bioluminiscencia se determinó por ensayo de la t de student de dos colas. En todos los análisis, P<0,05 se consideró estadísticamente significativo. Para la evaluación de la actividad anti-tumoral *in vivo*, la supervivencia global de los ratones se definió como el tiempo entre la inyección i.v. de las células tumorales y el sacrificio o muerte y se comparó a lo largo de los diferentes grupos de tratamiento con análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.

Perfilado de la expresión génica y proteómico de la inhibición de IGF-1R

El ARN total se extrajo y se purificó con el kit RNeasy de Qiagen (Qiagen, San Diego, CA). Cinco microgramos de ARN total se usaron en la síntesis de la primera cadena de ADNc con el cebador T7-d(T)₂₄ (GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄) (SEQ ID NO: 1) y Superscript II (GIBCO-BRL, Rockville, MD). La síntesis de la segunda cadena de ADNc se realizó a 16°C añadiendo ADN ligasa de *Escherichia coli*, ADN polimerasa I de *E. coli* y RNasa H a la reacción, seguido de ADN polimerasa T4 para hacer romos los extremos del ADNc recién sintetizado. El ADNc se purificó mediante precipitación con fenol/cloroformo y etanol. Usando el Kit de Bioarray de Marcaje de Transcrito de ARN de Alto Rendimiento (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY), el ADNc purificado

se incubó a 37°C durante 5 h en una reacción de transcripción *in vitro* para producir ARNc marcado con biotina. El ARNc (20 µg) se fragmentó por incubación en un tampón que contenía 200 mM Tris-acetato (pH 8,1), 500 mM KOAc y 150 mM MgOAc a 94°C durante 35 min. La mezcla de hibridación que contenía 15 µg de ARNc fragmentado ajustado mezclado con controles de Hibridación Eucariotas (que contiene ARNc control y oligonucleótido B2) se hibridó con un chip U133A humano de Affymetrix pre-equilibrado a 45°C durante 16 h. Después de eliminar las mezclas de hibridación, los chips se lavaron en una estación fluidica con tampón de baja astringencia (6 X disolución salina fosfato estándar con EDTA, 0,01% Tween 20, y 0,005% antiespumante) durante 10 ciclos (dos mezclas/ciclo) y tampón de alta astringencia (100 mM ácido N-morfolino-etanosulfónico (MES), 0,1 M NaCl y 0,01% Tween 20) durante cuatro ciclos (15 mezclas/ciclo) y se tiñeron con SAPE (estreptavidina ficoeritrina). Este proceso se siguió de una incubación con IgG de cabra normal y anticuerpo anti-estreptavidina de ratón biotinilado y se volvió a teñir con SAPE. Los chips se escanearon en un ChipScanner HP (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA) para detectar las señales de hibridación. Los archivos resultantes de imágenes escaneadas se examinaron visualmente para defectos de chip importantes y artefactos de la hibridación y se analizaron con el programa informático GeneChip Microarray Analysis Suite 5.0 de Affymetrix (Affymetrix). La imagen de cada GeneChip se escaló de manera que el valor de la intensidad medio para todas las matrices se ajustó a una intensidad diana de 150. Los archivos de análisis de expresión creados por el programa informático GeneChip Microarray Analysis Suite 5.0 se exportaron como archivos de texto normales a Microsoft Excel y se usaron para análisis adicionales. Se realizaron análisis de los datos para identificar las señales que eran al menos dos veces diferentes entre las muestras tratadas con inhibidor de IGF-1R y sus controles respectivos. Estos resultados se cribaron para valores p menores de 0,0025 en ensayo de la *t* de Student, para identificar los transcritos que estaban inducidos o reprimidos. Para los análisis de agrupación jerárquica, los datos se importaron en el programa informático Gene Cluster y TreeView (Universidad de Stanford, Stanford, CA). Los programas informáticos adicionales usados para minería de datos incluyen GeneSpring 5.0 (Silicon Genetics). Los datos se visualizaron usando el programa Rainbow (desarrollado por Charles Bailey y Towia Libermann) que permite la representación de datos en formato de color según sus valores en una escala logarítmica y con el Analizador DNA-Chip (dChip)³, que está disponible libremente para los usuarios académicos en www.dchip.org. Las anotaciones e informaciones para todos los genes se recuperaron usando el sitio web de NetAffx (Affymetrix) y UnChip (Alberto Riva, Atul Butte e Isaac Kohane; Childrens Hospital, Boston) y se añadieron al archivo de datos. Los datos anotados se clasificaron según relaciones funcionales.

Análisis proteómicos del estado de señalización de las células MM

Se realizaron análisis proteómicos globales de alto rendimiento del estado de señalización de las células MM tratadas con PS-341 con matrices de inmunotransferencia múltiples usando las plataformas KPKS-1.0 y KPSS-1.0, como se ha descrito previamente (Mitsiades CS et al. *Semin Oncol.* 2003 Abr; 30(2): 156-160 y Mitsiades N et al. *Blood.* 2003 15 Mar; 101(6): 2377-80).

Actividad quimiopéptica del proteasoma, actividad de unión al ADN de NFκB y HIF-1α

El ensayo para la actividad quimiopéptica del proteasoma 20S se realizó como se ha descrito [Shringarpure 2003]. La actividad transcripcional de la actividad de unión al ADN de NF-κB y HIF-1α se midió como se ha indicado previamente. Libermann TA, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*; 2002 99: 14374-14379; Mitsiades N. et al., 2002, 99: 4079-4086; Mitsiades N. et al., 2002; *Blood* 99: 4525-4530 y Mitsiades N., et al 2003 *Blood*; 101: 2377-2380.

Evaluación de la fosforilación de IGF-1R en las células MM tratadas con AEW541

Para evaluar el grado de supresión de la fosforilación de IGF-1R después del tratamiento con AEW-541, las muestras de células MM tratadas con NVP-AEW541 se procesaron por ELISA de captura de fosfo-IGF-1R. Brevemente, aspirados no purificados de médula ósea de 11 pacientes MM se trataron *ex vivo* bien con NVP-AEW541 (250 nM durante 15 min) o un volumen igual de DMSO control. Posteriormente, cada muestra tratada con fármaco y control de cada paciente se purificó por selección negativa usando una mezcla RosetteSep personalizada de anticuerpos monoclonales (mAb) para la purificación negativa de células MM CD138⁺ (la mezcla incluye anticuerpos frente a CD2, CD14, CD33, CD41, CD45RA y CD66b). (Los ciclos simultáneos de muestras de aspirado de BM de pacientes adicionales confirmaron que este proceso da lugar al aislamiento de una población de células MM >95% CD138⁺ CD38⁺). Las células purificadas se sedimentaron, se congelaron a -80°C y se almacenaron hasta terminar la recogida de las muestras respectivas tratadas con fármaco y control de todos los pacientes (las muestras de diferentes pacientes se trataron y se procesaron para la purificación de las células MM a diferentes tiempos). Después de la recogida de las muestras de todos los pacientes, los sedimentos celulares respectivos se lisaron y se procesaron para ELISA de captura de IGF-1R. Brevemente, se recubrieron placas Nunc-Immuno™96 MicroWell™ con anticuerpo anti-IGF-1R humano de ratón (Santa Cruz, sc-462) seguido de incubación con Ab anti-Fosfo-IGF-1R humano de conejo (Tyr1131)/fosfo-IR (Tyr1146) (3021L, Cell Signaling Technologies, Beverly MA) e incubación posterior con Ab 2º biotinilado (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, # 711-066-152), seguido de incubación con conjugado estreptavidina-HRP y detección usando el sustrato ABTS/H₂O₂.

55

Evaluación de la fosforilación de Akt en las células MM tratadas con AEW541

Para evaluar el grado de supresión de la fosforilación de Akt después del tratamiento con NVP-AEW-541, los aspirados no purificados de médula ósea de 9 pacientes MM (diferentes de los del ELISA de captura de la fosforilación de IGF-1R) se trataron *ex vivo* bien con AEW541 (250 nM durante 15 min) o un volumen igual de DMSO control. Posteriormente, cada muestra tratada con fármaco y control de cada paciente se purificó por selección negativa usando una mezcla RosetteSep personalizada de anticuerpos monoclonales (mAb) para la purificación negativa de células MM CD138⁺ (como se ha descrito en el ensayo previo). Las células purificadas se sedimentaron, se congelaron a -80°C y se almacenaron hasta terminar la recogida de las muestras respectivas tratadas con fármaco y control de todos los pacientes (las muestras de diferentes pacientes se trataron, se procesaron y se purificaron a diferentes tiempos). Después de la recogida de las muestras de todos los pacientes, los sedimentos celulares respectivos se lisaron y se procesaron para ELISA sandwich de fosfo-Akt con el uso de un kit disponible comercialmente (Pathscan® Phospho-Akt1 (Ser473) Sandwich ELISA Kit, Cell Signaling, Beverly, MA). Brevemente, los sedimentos celulares de los experimentos mencionados anteriormente se lisaron con Tampón de Lisis Celular IX (Cell Signaling Technologies, Beverly MA, #9803) suplementado con 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en cada placa, se sonicaron y se microcentrifugaron durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo, se alicuotaron para un contenido igual de proteínas, se diluyeron 1:1 con tampón de lisis y se añadieron en duplicados en los pocillos de una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpo específico anti-fosfo-Ser473-Akt. Después de una incubación toda la noche a 4°C, los pocillos se incubaron con un mAb de detección de Akt1 (2H10), se lavaron y se expusieron a un anticuerpo secundario conjugado con HRP, seguido de la adición de Sustrato TMB durante 30 minutos a 25°C y adición de 100 µl de Disolución de Parada, antes de la medida de la absorbancia a 450 nm en los 30 minutos siguientes a la adición de la Disolución de Parada.

Ejemplo 2. Caracterización de la expresión de IGF-1R en malignidades hematológicas y tumores sólidos

Se usó citometría de flujo para estudiar un panel de 75 líneas celulares tumorales hematológicas y de tumor sólido (Tabla 1) para la expresión de IGF-1R usando 2 anticuerpos monoclonales diferentes anti-IGF-1R humano. La expresión universal de IGF-1R en la superficie celular se encontró en todas las líneas celulares ensayadas, incluyendo las malignidades hematológicas (mieloma múltiple, varios subtipos de leucemias y linfomas), así como tumores sólidos (cáncer de próstata, mama, pulmón, colon, tiroides, ovario, renal, adrenal, sarcomas y retinoblastoma). Para descartar la posibilidad de que la expresión de IGF-1R sea un artefacto inducido por la propagación *in vitro*, se examinaron 35 especímenes de tumor de mieloma múltiple (MM) primario recién aislados, incluyendo muestras de pacientes con resistencia a quimioterapia convencional o de alta dosis, así como clases de agentes anti-tumorales recientemente añadidas al armamento terapéutico frente a MM, incluyendo talidomida, sus análogos inmunomoduladores (CC-5013) y el inhibidor de proteasoma bortezomib (PS-341). La expresión en la superficie celular de IGF-1R también estuvo presente de manera universal en estas muestras primarias de pacientes (Fig. 7). De forma interesante, no hubo un patrón discernible de asociación entre el grado de expresión en la superficie de IGF-1R y el tipo de tumor, subtipo histológico o resistencia a fármacos anti-cancerosos (por ejemplo, agentes alquilantes, antraciclinas, dexametasona, talidomida, CC-5013, TRAIL/Apo2L o PS-341).

Tabla 1.

Tipo de tumor	Líneas celulares
Mieloma Múltiple	MM-1S, MM-1R, MM-1S-Akt, MM-1S-Bcl-2, MM-1S-TR13, RPMI-8226/S, RPMI-8226/Dox40, RPMI-8226/LR5, RPMI-8226/MR20, OPM-1, OPM-2, OPM-6, OCI-My5, OCI-My7, SKMM2, KMS-12-BM, KMS-12-PE, Brown, XG-1, L363, S6B45, U266, EJM, LP-1, S6B45, INA-6, NC1-H929, ARD, ARK, ARP-1, K620, KMM1, MM-AS, MM-SV y MM-SAR-1.
Leucemias	REH (leucemia linfocítica aguda, no T no B) NALM-6 (leucemia linfocítica aguda pre células B) KG-1a (eritroleucemia aguda) GDM-1 (leucemia mielomonoblástica aguda) HL-60 (leucemia promielocítica aguda)

ES 2 368 741 T3

	K562 (leucemia mielógena crónica, crisis blástica)
Linfomas	DHL-4, -6, -7, -8, -10 (linfomas de células B grandes difusos) Namalwa (linfoma de Burkitt) WM-WSU (Macroglobulinemia de Waldenstrom)
Cáncer de mama	MCF-7, MDA-MB-231, ZR-75-1
Cáncer de próstata	PC-3, LNCaP, DU-145
Cáncer de pulmón	NCI-H526
Cáncer de colon	SW480
Cáncer adrenal	SW13, NCI-H295
Cáncer de tiroides	FRO, ARO, NPA (anaplásico), WRO (folicular) TT (medular), BHP-2, BHP-10, BHP-17, SW579 (papilar)
Cáncer renal	ACHN, CAKI-1, 786-O
Cáncer de ovario	36M, SKOV-3
Retinoblastoma	Y79, WER1
Sarcomas	SK-N-MC, TC71, TC106, TC248, TC268

Ejemplo 3. Análisis de la actividad anti-tumoral *in vitro* de los inhibidores de IGF-1R

El impacto funcional de la inhibición específica de la activación de IGF-1R en células tumorales se cuantificó *in vitro* con los ensayos colorimétricos de supervivencia MTT, para evaluar el grado en el que la inhibición de la función de IGF-1R puede suprimir la capacidad del suero (que contiene IGF) para estimular un incremento en la población de células tumorales viables. Estos ensayos implicaron el uso de 10% ó 20% de suero fetal bovino y/o sueros agrupados de donantes sanos o sueros de pacientes con mieloma múltiple (MM), en comparación con condiciones sin suero. La inhibición específica de la función de IGF-1R se consiguió mediante el uso de un anticuerpo monoclonal neutralizante α -IR3; el antagonista peptídico competitivo semejante a IGF-1 JB-1 o el inhibidor selectivo de la quinasa de IGF-1R ADW-742 (Novartis Pharma AG, Basilea, Suiza). Los ensayos celulares de actividad quinasa han demostrado que ADW-742 tiene un efecto inhibitor >16 veces más potente frente a IGF-1R que al receptor de insulina (IR), la quinasa con mayor homología con IGF-1R (CI₅₀ 0,17 y 2,8 μ M, respectivamente, en ensayos celulares de auto-fosforilación). Las tres estrategias inhibitoras anti-IGF-1R suprimen significativamente el incremento estimulado por suero de la población total de células tumorales viables en todas las líneas celulares ensayadas (Fig. 1a, b, e). Estos resultados indican que los IGF son mediadores clave de la capacidad del suero para estimular la proliferación de las células tumorales *in vitro* y que la inhibición específica de la función de IGF-1R supera la capacidad de otros factores de crecimiento séricos para estimular la proliferación/crecimiento.

Para determinar las diferencias específicas del tipo de célula en respuesta a la inhibición de IGF-1R, se ensayó el efecto de ADW-742 sobre la viabilidad de 58 líneas celulares tumorales hematológicas y de tumor sólido. En todas las líneas celulares se observa una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento celular inducido por suero (Fig. 1e). Como grupos, las líneas celulares MM parecen ser más sensibles a los efectos de ADW-742, con valores de CI₅₀ generalmente en el intervalo 0,1-0,5 μ M, en comparación con los valores CI₅₀ relativamente mayores observados en la mayor parte de las demás líneas celulares tumorales hematológicas y de tumor sólido.

Además, se validó el efecto de la inhibición de IGF-1R sobre la viabilidad de las células MM purificadas a partir de muestras primarias de pacientes en ensayos de cultivo a corto plazo inmediatamente después del aislamiento. En todas las muestras primarias de pacientes ensayadas, la inhibición de IGF-1R con un anticuerpo neutralizante o ADW-742 suprime completamente el crecimiento inducido por suero (Fig. 1c, d). Como control de especificidad, un anticuerpo neutralizante anti-receptor de IL-6 (IL-6R) no tiene efectos discernibles en la viabilidad de las células MM cultivadas en suero (Figs. 1a, c, d). Este descubrimiento puede parecer contraintuitivo con el papel ampliamente aceptado de IL-6 en

la proliferación, supervivencia y resistencia a fármacos de las células tumorales en MM y otras enfermedades, por ejemplo, cáncer de próstata, surgiendo la posibilidad de que las concentraciones de IL-6 en suero no son suficientes para estimular a las células tumorales. Sin embargo, se determinó que la respuesta de las células MM y de cáncer de próstata a la administración exógena de IL-6 (a niveles en el intervalo 1-10 ng/mL, que son 2-3 logs mayores que los niveles séricos de IL-6) también es suprimida por la inhibición de IGF-1R (Figura 8). Estos descubrimientos subrayan el papel de la función de IGF-1R en la jerarquía de los sistemas de receptor de factor de crecimiento en las células tumorales.

Además, ADW-742, α -IR3 o JB-1 son activos incluso frente a las líneas celulares MM con resistencia conocida a agentes anti-cancerosos convencionales (quimioterapia citotóxica, dexametasona) o investigacionales (talidomida, CC-5013, TRAIL/Apo2L, PS-341) (Fig. 1), así como células tumorales primarias de pacientes MM con enfermedad resistente a múltiples fármacos (Fig. 1d). Además, el grado de sensibilidad de MM u otras neoplasias a los inhibidores de IGF-1R no está asociado con el nivel de la expresión en la superficie de IGF-1R (Fig. 7). Como la cascada de IGF/IGF-1R puede ser contrarrestada por la expresión del receptor 2 de IGF (IGF-2R, IGF-IIR, CD222 o CIMPR), se analizó la expresión de IGF-2R en el panel de células tumorales descrito en la Tabla 1. IGF-2R se expresa en la superficie de una minoría de líneas celulares tumorales pero se encuentra intracelularmente en el panel completo de células tumorales ensayado (Figura 9). No se observó ninguna asociación discernible entre el grado de la expresión de IGF-2R superficial ni intracelular y el tipo de tumor, subtipo histológico o resistencia al panel mencionado anteriormente de fármacos anti-cancerosos convencionales e investigacionales. Tampoco hay una asociación aparente entre los niveles de IGF-2R y la sensibilidad a la inhibición de IGF-1R.

20 **Ejemplo 4. Determinación de la actividad anti-tumoral *in vivo* del inhibidor selectivo de la quinasa de IGF-1R ADW-742**

Se examinó la actividad anti-tumoral *in vivo* de la inhibición de IGF-1R en un modelo de xenoinjerto de MM en ratón. La línea celular MM-1S se preparó por ingeniería para expresar de manera estable la luciferasa de luciérnaga fusionada con un marcador seleccionable (neomicina fosfotransferasa o GFP incrementada). Se inyectó a ratones NOD/SCID irradiados sub-letalmente por vía intravenosa células MM-1S-Luc y se siguió la distribución del tumor por formación de imágenes no invasiva del cuerpo completo de luz visible emitida por las células tumorales que expresan luciferasa después de la inyección a los ratones de luciferina. Dada la importancia del microentorno tumoral en la biología de MM, se estableció un sistema de modelo de lesiones esqueléticas difusas de MM. Las inyecciones intravenosas de células MM-1S-Luc dio lugar a su prendimiento en la médula ósea y hueso y al establecimiento consistente de lesiones óseas difusas en el esqueleto axial (vértebras, cráneo, pelvis) y huesos largos (Fig. 2a). La distribución anatómica de estas lesiones MM es consistente con la presentación de la enfermedad en pacientes de MM humanos y la progresión a invasión visceral difusa resume la implicación esquelética y extraesquelética diseminada de las células plasmáticas malignas en MM clínicamente agresivo (por ejemplo, leucemia de células plasmáticas).

La eficacia anti-tumoral *in vivo* de la inhibición de IGF-1R con ADW-742 se analizó en el modelo de MM ortotópico descrito anteriormente. Se inyectó a ratones NOD/SCID irradiados sub-letalmente células MM-1S-Luc y se formaron imágenes de manera seriada para monitorizar la carga tumoral. Después de 2-3 semanas, se dividieron cohortes de ratones con una carga tumoral creciente de manera similar en grupos control y tratamiento. En este modelo de MM, la monoterapia con ADW-742 (10 mg/kg i.p. dos veces al día) suprime significativamente el crecimiento tumoral (Fig. 2b) y prolonga la supervivencia de los ratones (Fig. 2c). No hay diferencia en el peso corporal entre los grupos de tratamiento ($P=0,82$) ni ninguna toxicidad significativa adicional relacionada con el tratamiento. Se obtuvieron resultados consistentes con un segundo estudio con la misma dosificación i.p., así como un tercer estudio utilizando ADW-742 dosificado oralmente a 50 mg/kg dos veces al día.

45 **Ejemplo 5. Secuelas moleculares de la inhibición de IGF-1R**

Para investigar las rutas moleculares implicadas en la activación de IGF-1R y, a la inversa, su inhibición, se caracterizaron las secuelas moleculares desencadenadas en las células MM después de su exposición a inhibidores de IGF-1R (en presencia o ausencia de suero) usando perfilado de la expresión génica (con micromatrices de oligonucleótidos U133A Affymetrix) y perfilado proteómico de la transducción de la señal (usando análisis de inmunotransferencia múltiples). La significancia funcional de los descubrimientos detectados en los ensayos de perfilado molecular globales se confirma por ensayos mecanísticos específicos.

El perfilado de expresión global revela distintos perfiles transcripcionales que distinguen a las células sin suero de las células estimuladas con suero (Fig. 3a). Las células tratadas únicamente con niveles fisiológicos de IGF-1 (pero de otra manera sin suero) tienen perfiles de expresión consistentes con los de las células expuestas a suero. A la inversa, cuando las células expuestas a suero se tratan bien con α -IR3 o con ADW-742, los perfiles de expresión se agrupan con los de las células crecidas en condiciones sin suero como se muestra por el agrupamiento jerárquico no supervisado (Fig. 3a). Por lo tanto, la activación de IGF-1R por los IGF contenidos en el suero constituye una parte importante de los

efectos transcripcionales del suero. Además, los efectos globales de la inhibición de IGF-1R con ADW-742 o un anticuerpo neutralizante específico concuerdan, apoyando así adicionalmente la especificidad de la actividad de ADW-742. Debe indicarse que los análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado muestran que los perfiles de expresión génica de las células MM tratadas con inhibidor de IGF-1R (ADW-742 y α -IR3) corresponden a un grupo distinto, separado de otros grupos que corresponden a los perfiles de células MM tratadas con otros agentes anti-MM potentes (incluyendo bortezomib, inhibidores de hsp90 e inhibidor de histona desacetilasa). Esto indica que las distintas secuelas moleculares de la inhibición de IGF-1R no reflejan una citotoxicidad o efecto anti-proliferativo inespecífico.

Los estudios de perfilado de la expresión, análisis proteómicos y ensayos de confirmación posteriores muestran que la exposición de las células tumorales a IGF-1 o suero está asociada con una constelación altamente pleiotrópica de eventos moleculares proliferativos/anti-apoptóticos, que están suprimidos por la inhibición de IGF-1R con ADW-742 o α -IR3 (Fig. 3-5 y S4). La inhibición de IGF-1R da lugar a una expresión disminuida de los genes implicados en la progresión del ciclo celular/proliferación y fosforilación disminuida de Rb; niveles disminuidos de inhibidores de caspasa (por ejemplo, FLIP, XIAP, cIAP-2, survivina) y otros reguladores anti-apoptóticos (por ejemplo, A1/Bfl-1); supresión de múltiples genes implicados en la síntesis de ADN y reparación de daños en el ADN; disminución significativa de la actividad telomerasa constitutiva y estimulada por suero; supresión de genes implicados en la transformación oncogénica (por ejemplo, c-myc, DEK) y fosforilación disminuida (y niveles totales) de la familia Aurora de quinasas; expresión disminuida de los transcritos que codifican las subunidades del proteasoma 26S, modulación de otros genes que regulan la función del proteasoma (por ejemplo, proteasas específicas de ubiquitina y enzimas de conjugación de ubiquitina) y supresión de la activación constitutiva e inducida por suero de la actividad del proteasoma; expresión disminuida de genes para el transporte nucleocitoplásmico y otras proteínas transportadoras de soluto que regulan la captación de glucosa y otros metabolitos; supresión de las proteínas de choque térmico (por ejemplo, hsp90); fosforilación disminuida de quinasas críticas y dianas de quinasas en la ruta PI-3K/Akt (incluyendo Akt, p70S6K, GSK3beta, FKHRL-1), ruta Raf/ERK1/2 (MEK1/2), Src, STAT3 y FAK (quinasa de adhesión focal); supresión de los niveles intracelulares totales de las quinasas implicadas en las respuestas proliferativas/anti-apoptóticas, incluyendo Akt, p70S6K, Raf, Src, Bmx, IKK y PDK1 (quinasa dependiente de PI-3K); y supresión de la actividad transcripcional de NF- κ B y HIF-1 α , 2 dianas aguas abajo de IKK y Akt, respectivamente.

La constelación altamente pleiotrópica de rutas proliferativas/anti-apoptóticas que se estimulan por el suero y, a la inversa, se inhiben con ADW-742 explica la potente señal de crecimiento/supervivencia mediada por IGF-1R y el impacto importante de los inhibidores de IGF-1R en un amplio rango de tipos de tumores en este estudio. Varias secuelas moleculares de la inhibición de IGF-1R dilucidadas por estos estudios son consistentes con descubrimientos indicados previamente (por ejemplo respecto a la función de Akt, FKHRL-1, NF- κ B y HIF-1 α o la expresión de inhibidor de caspasa), mientras que también se revelan descubrimientos previamente no identificados. Por ejemplo, la inhibición de IGF-1R modula el estado de señalización de las células tumorales no sólo por cambios en la fosforilación de los componentes de PI-3K/Akt, Ras/Raf/ERK1/2, IKK/NF- κ B u otras cascadas de señalización, sino también por la modulación de la concentración intracelular de componentes de estas rutas, incluyendo quinasas clave tales como Akt, Raf e IKK. La señalización de IGF/IGF-1R activa/regula al alza varios efectores de la señalización (por ejemplo, Akt, Raf, IKK) y participa en las cascadas de transducción de la señal desencadenadas por otras citoquinas/factores de crecimiento y sus receptores. Los perfiles transcripcionales del tratamiento con inhibidor de IGF-1R de células MM cultivadas en suero son comparables con los perfiles en condiciones sin suero (Fig. 3a), lo que resalta un papel crítico de la función de IGF-1R para las respuestas transcripcionales de las células tumorales frente al espectro completo de factores de crecimiento presentes en el suero.

Ejemplo 6. La inhibición de IGF-1R sensibiliza a las células tumorales frente a otros agentes anti-cancerosos

Varias rutas suprimidas por la inhibición de IGF-1R son críticas para la resistencia de las células tumorales a terapias pro-apoptóticas y/o constituyen dianas conocidas para las terapias anti-cancerosas. Como ejemplo no limitativo, los inhibidores de Akt, NF- κ B y caspasa confieren resistencia a muchas terapias anti-cancerosas pro-apoptóticas dependientes de caspasa (incluyendo dexametasona, TRAIL/Apo2L, inhibidores de proteasoma, análogos de talidomida), mientras que la actividad de NF- κ B y los genes de reparación del daño en el ADN juegan papeles críticos en la resistencia de las células tumorales a la quimioterapia citotóxica. Además, la función del proteasoma es una diana de la molécula pequeña inhibidora PS-341 que ha surgido recientemente.

Se determinó la capacidad de los inhibidores de IGF-1R para sensibilizar a las células tumorales frente a otras terapias anti-cancerosas *in vitro*. ADW-742 o α -IR3 incrementa la sensibilidad de las células MM frente a varios agentes quimioterapéuticos citotóxicos (doxorubicina, melfalán), dexametasona, TRAIL/Apo2L o PS-341 (Figuras 6a-c y 12), la sensibilidad de las células de cáncer de próstata frente a doxorubicina, o la respuesta de las células de sarcoma SK-N-MC a la unión de Fas. Estos datos indican un papel más amplio de la señalización de IGF/IGF-1R en la atenuación de la capacidad de respuesta a fármacos anti-cancerosos en múltiples neoplasias y la utilidad potencial de los inhibidores de IGF-1R para potenciar la actividad anti-tumoral de un amplio espectro de estrategias terapéuticas anti-cancerosas.

Además, la supresión de la función del proteasoma por la inhibición de IGF-1R proporciona la primera evidencia de regulación mediada por factor de crecimiento de la función del proteasoma. Este descubrimiento ofrece una explicación mecanística no limitativa de la sinergia demostrada entre la inhibición de IGF-1R y PS-341 (Fig. 6b), que es consistente con las observaciones de que la señalización inducida por IGF-1 atenúa la sensibilidad de las células MM a PS-341 y presenta implicaciones importantes para las potenciales aplicaciones clínicas de los inhibidores de IGF-1R para potenciar la actividad anti-tumoral de los inhibidores del proteasoma.

Ejemplo 7. Efecto de la inhibición de IGF-1R en las interacciones de las células tumorales con el microentorno de BM y la producción de VEGF

La importancia de los elementos estromales en el apoyo del crecimiento tumoral es muy conocida, particularmente en las malignidades osteotrópicas, tales como MM, en las que los elementos estromales del microentorno de BM confieren efectos protectores a las células tumorales frente a varias terapias anti-tumorales. Este efecto protector puede ser particularmente relevante para las estrategias que tienen como diana IGF-1R, ya que los IGF se producen localmente en el medio de BM por las células estromales de BM (BMSC) y los osteoblastos y porque el co-cultivo de las células MM con BMSC potencia significativamente la producción de IGF-1 *in vitro* (Figura 12c). Sin embargo, en ensayos de co-cultivo de células MM y BMSC, esta interacción no supera los efectos anti-tumorales de ADW-742 en las células MM (Fig. 12a), incluso a concentraciones que no afectaban la viabilidad de BMSC (Fig. 12c). Además, consistente con su capacidad para suprimir la actividad de HIF-1 α inducida por IGF-1, ADW-742 disminuye la producción de VEGF por las células tumorales y las células estromales de la médula ósea (Fig. 12d) y suprime la secreción de VEGF inducida por IGF-1 por varios tipos de tumores tales como células de cáncer de tiroides (Fig. 12e) o células MM, lo que sugiere efectos anti-angiogénicos potenciales de la inhibición de IGF-1R (Fig. 12d). Estos resultados indican que la señalización de IGF/IGF-1R juega papeles importantes en las interacciones de las células tumorales con su microentorno local, incluyendo protección estromal de las células tumorales o angiogénesis asociada al tumor, y proponen una base mecanística racional para el uso de los inhibidores de la quinasa de IGF-1R con el fin de maximizar la eficacia *in vivo* de otras terapias anti-tumorales.

Ejemplo 8: Efecto de quimiosensibilización *in vivo* de la inhibición de IGF-1R con ADW-742

Tomando como base el efecto de quimiosensibilización *in vitro* de ADW-742 en las células tumorales, se evaluó un modelo clínicamente relevante de lesiones esqueléticas difusas MM-1S-luc en ratones SCID/NOD para la actividad *in vivo* de un pulso de ADW-742 (10 mg/kg i.p. dos veces al día, 4 días a la semana) administrado después de melfalán a dosis bajas (2,5 mg i.p. una vez a la semana). A diferencia de la administración continua de ADW-742, la administración pulsátil de ADW-742 no tiene una actividad anti-tumoral significativa (Fig. 6d, y datos no mostrados). Sin embargo, consistente con los datos *in vitro*, la combinación de melfalán sub-terapéutico seguido de ADW-742 sub-terapéutico tiene un efecto sinérgico en la prolongación de la supervivencia de los ratones (Fig. 6d). Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que la supresión de la señalización de IGF-1/IGF-1R después de la terapia citotóxica potencia la eficacia de las terapias convencionales por la eliminación de señales anti-apoptóticas clave.

Ejemplo 9: Actividad anti-proliferativa *in vitro* de NVP-AEW541 frente a un panel de líneas celulares de Mieloma Múltiple

Para evaluar el grado en el que la inhibición de la función de IGF-1R puede suprimir la capacidad del suero (que contiene los IGF) para estimular la proliferación de las líneas celulares MM, se aplicó un ensayo colorimétrico de supervivencia MTT a las células expuestas a concentraciones crecientes de NVP-AEW541 (Figura 13).

Ejemplo 10: Efecto de NVP-AEW541 sobre la viabilidad de muestras de tumor de Mieloma Múltiple primario *in vitro*

Se ensayó el efecto de la inhibición de IGF-1R sobre la viabilidad de las células MM purificadas a partir de muestras de pacientes primarias, en ensayos de cultivo a corto plazo realizados inmediatamente después del aislamiento. NVP-AEW541 a 0,5 μ M inhibió significativamente la supervivencia basal, así como la estimulada por suero de las células MM primarias (Figura 14).

Ejemplo 11: Efecto de la inhibición de la quinasa de IGF-1R sobre la respuesta a IL-6

Cuando se comparó el efecto de NVP-AEW541 (a 0,5 μ M) sobre la supervivencia de las células MM primarias con el de una estrategia anti-IL-6 (a 2 μ g/mL), se encontró sorprendentemente que la última tenía poco o ningún efecto, mientras que NVP-AEW541 suprimió la supervivencia estimulada por suero como se ha observado previamente (Figura 15). Este descubrimiento puede parecer contraintuitivo con el papel ampliamente aceptado de IL-6 en la proliferación, supervivencia y resistencia a fármacos de las células tumorales, sugiriendo la posibilidad de que las concentraciones séricas de IL-6 no son suficientes para estimular a las células tumorales. MM. Hallek M, et al 1998 Blood; 91: 3-21 y

Anderson KC, y Lust JA. 1999 *Semin Hematol*; 36: 14-20. Sin embargo, hemos encontrado además que la respuesta de las células MM a la administración exógena de IL-6 (a niveles en el intervalo 1-10 ng/mL, que son 2-3 logs mayores que los niveles séricos de IL-6. Nakashima J. et al 2000 *Clin Cancer Res*; 6: 2702-2706), también se suprimió por la inhibición de IGF-1R (Figura 16). Estos descubrimientos subrayan un papel fundamental aparente para la función de IGF-1R en la jerarquía de los sistemas de receptores de factores de crecimiento en las células tumorales.

Ejemplo 12: NVP-AEW541 reduce selectivamente la supervivencia de células MM primarias, a diferencia de las células estromales de médula ósea

Para evaluar si las células MM son más susceptibles a la inhibición de la señalización de IGF-1R que las células normales en su entorno cercano, se expusieron células MM primarias, células estromales normales de médula ósea y células B de sangre periférica a 0,5 μ M NVP-AEW541. Se mostró que la inhibición de la actividad quinasa de IGF-1R por el compuesto reducía significativamente la supervivencia de las células MM primarias obtenidas de tres pacientes, pero no tenía efecto en la viabilidad de las células estromales de médula ósea o las células B de sangre periférica (Figura 17).

Ejemplo 13: Estudios de combinación con NVP-AEW541 y agentes quimioterapéuticos estándar para el tratamiento de Mieloma Múltiple

Considerando el hecho de que la señalización de IGF-1R proporciona una señal de supervivencia celular y que esto parece jugar un papel importante en el mantenimiento de la viabilidad de las células MM *in vitro*, se evaluaron experimentos de combinación con agentes quimioterapéuticos usados en clínica para el tratamiento de pacientes con Mieloma Múltiple usando muestras MM primarias. Se encontró que NVP-AEW541 sensibilizaba a las células MM primarias sinérgicamente frente a la acción de Dexametasona (Figura 18), Doxorrubicina (Figura 19) y Melfalán (Figura 20). Además, NVP-AEW541 sensibilizaba a las células MM primarias frente al inhibidor de proteasoma bortezomib (PS-341) (Figura 21).

Ejemplo 14: NVP-AEW541 inhibe la actividad quimiotróptica del proteasoma

Estudios previos han mostrado que la señalización de IGF-1 estimula la expresión de subunidades seleccionadas del proteasoma (Mitsiades CS, et al. 2004 *Cancer Cell*; 5: 221-230) y da lugar a células MM menos sensibles a los inhibidores del proteasoma, tales como PS-341. Mitsiades N. et al, 2002 *Proc Natl Acad Sci USA*; 99: 14374-14379. Se encontró que NVP-AEW541 a 0,5 μ M inhibía la función del proteasoma, medida como actividad quimiotróptica, en muestras MM primarias (Figura 22).

Ejemplo 15: NVP-AEW541 inhibe la actividad de unión al ADN de NF κ B

Tomando como base la observación de que la señalización de IGF-1 en las células MM desencadena múltiples eventos aguas abajo, tales como la activación de IKK (Mitsiades CS, et al. 2004 *Cancer Cell*; 5: 221-230), se ensayó el efecto de NVP-AEW541 en la activación de NF κ B, medido como una función de su actividad de unión al ADN. A 0,5 μ M, se encontró que NVP-AEW541 reducía significativamente la actividad de unión al ADN de NF κ B (Figura 23).

Ejemplo 16: NVP-AEW541 inhibe la actividad de unión al ADN de HIF-1 α

Se ha indicado que la señalización de IGF-1 tiene función pro-angiogénica por la inducción de la actividad transcripcional de HIF-1 α y la expresión de VEGF. Fukuda R., et al. 2002 *J Biol Chem*; 277: 38205-38211.

Consiste con esto, se encontró que NVP-AEW541 a 0,5 μ M inhibe la actividad de unión al ADN de HIF-1 α en células de mieloma múltiple primarias (Figura 24).

Ejemplo 17: Monitorización del nivel de fosfo-IGF-1R y fosfo-Akt en muestras de Mieloma Múltiple primarias después de la exposición *ex vivo* a NVP-AEW541

Para evaluar la posibilidad de desarrollar una metodología adecuada para la detección de cambios farmacodinámicos al nivel de la fosforilación de IGF-1R o de la fosforilación de Akt aguas abajo, se trataron muestras de mieloma múltiple obtenidas de pacientes primarios *ex vivo* con 0,25 μ M NVP-AEW541 o su disolvente DMSO. Las células de mieloma múltiple CD138⁺ se enriquecieron por selección negativa y se usaron para monitorizar el nivel de fosfo-IGF-1R y fosfo-Akt por ELISA de captura. Las muestras expuestas a NVP-AEW541 mostraron de manera consistente una reducción notable en el nivel de fosfo-IGF-1R (Figura 25) y fosfo-Akt (Figura 26), comparado con los controles tratados con vehículo.

Ejemplo 18: Eficacia de NVP-AEW541 en un Modelo de Ratón Ortotópico de Mieloma Múltiple

ES 2 368 741 T3

Se crearon células MM1S-LucNeo por transducción de las células MM1S con un retrovirus que codifica la región codificadora de la luciferasa de luciérnaga fusionada con neomicina fosfotransferasa (pMMP-LucNeo). Las células transducidas se seleccionaron por crecimiento en medio (RPMI, 10% FBS, penicilina/estreptomina) que contiene G418 a una concentración eficaz de 1 mg/ml.

5 Se irradiaron subletalmente ratones NOD-SCID (Jackson Laboratory) con 300 rads de una fuente de ¹³⁷Cs. Tres horas después de la irradiación, se inyectó un total de 5×10^6 células MM1S-LucNeo en fase de crecimiento semilogarítmica a través de la vena de la cola en cada ratón en un volumen de 300 μ L de PBS. Los ratones se mantuvieron en condiciones estériles.

10 Se realizó formación de imágenes por bioluminiscencia con un Sistema de Formación de Imágenes In Vivo Xenogen (IVIS 100). Los ratones se anestesiaron por inyección IP de ketamina 150 mg/kg y xilazina 12 mg/kg y simultáneamente se administró D-luciferina 50 mg/kg por inyección IP. La formación de imágenes se realizó 15 minutos después de la inyección de D-luciferina con un ajuste de 2 minutos y un ajuste de intervalo de 2. Se permitió que los ratones se recuperaran en condiciones isotérmicas. Se formaron imágenes de los ratones semanalmente empezando 2 semanas después de la inoculación del tumor. Los ratones con carga tumoral creciente se dividieron en 2 cohortes estadísticamente equivalentes y el tratamiento empezó 4 semanas después de la inoculación del tumor. NVP-AEW541 se disolvió en 25 mM ácido tartárico a una concentración de 5 mg/ml y se administraron 10 μ L/g de peso corporal por sonda oral dos veces al día, para una dosis final de 50 mg/kg PO BID. El vehículo fue 25 mM ácido tartárico solo, de nuevo administrado a 10 μ L/g de peso corporal.

20 El efecto de la administración de AEW541 en el crecimiento del tumor de mieloma múltiple ortotópico se evaluó por formación de imágenes por bioluminiscencia *in vivo*. La carga tumoral se redujo significativamente después de 15 días de tratamiento ($p=0,04$, ensayo de la *t* de student). Debe indicarse que 4/8 animales tratados con vehículo murieron entre la formación de imágenes del día 8 y la formación de imágenes del día 15 de tratamiento. Como los animales que murieron de la enfermedad tenían la carga tumoral más alta, la diferencia significativa en la carga tumoral en los grupos de tratamiento fue posiblemente una subestimación de la diferencia real de la eficacia anti-tumoral. No hubo diferencia en el peso corporal después de 8 días de tratamiento ($p=0,58$).

30 Estos resultados son una extensión de estudios más completos que demuestran la eficacia *in vivo* de NVP-ADW742 en un modelo de xenoinjerto ortotópico en ratón de mieloma múltiple (Mitsiades et al. 2004 Cancer Cell; 5: 221-230). El grado de supresión del tumor es similar comparando la eficacia de NVP-AEW541 (Figura 27) y NVP-ADW742 (Mitsiades et al. 2004 Cancer Cell; 5: 221-230; Figura 3) y concuerdan con la similitud de la eficacia *in vitro* de estos dos compuestos.

Ejemplo 19: Evaluación del Efecto de AEW541 en el Crecimiento de Cáncer de Mama

35 Se estudió el efecto de AEW541 en el crecimiento de células de cáncer de mama en un modelo de metástasis ósea. Se inocularon fragmentos de hueso humano con una línea celular de cáncer de mama (MDA-MB231-LucNeo) y se implantaron en ratones desnudos. Se permitió que los fragmentos de hueso y las células tumorales "enraizaran" durante 2 semanas y se inició el tratamiento con AEW541. El crecimiento de las células tumorales se siguió por formación de imágenes durante las 4 semanas posteriores, demostrando un claro efecto anti-tumoral en este modelo de ratón de metástasis de cáncer de mama en el hueso (Figura 28).

Ejemplo 20: Combinación de terapias anti-tumorales usando AEW541

40 Se evaluó el uso potencial de AEW541 en combinación con otros terapéuticos dirigidos. Una línea celular de glioma (U87-LucNeo) se implantó estereotácticamente en los cerebros de ratones desnudos. 10 días después del implante, los ratones se dividieron en grupos tratados con AEW541 solo, AMD3100 solo (un inhibidor de CXCR4), ambos en combinación o vehículo control. El crecimiento de los tumores se monitorizó por formación de imágenes, revelando una eficacia anti-tumoral aditiva de AEW541 en combinación con AMD3100. Figura 29.

ES 2 368 741 T3

REIVINDICACIONES

1. Un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico y una composición que comprende un inhibidor del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1R) para usarse en la inhibición del crecimiento de células de mieloma múltiple en un sujeto, en el que dicho inhibidor de IGF-1R es ADW-742 o NVP-AEW541.
- 5 2. El agente y la composición de la reivindicación 1, en el que dicha composición se administra simultáneamente con dicho agente.
3. El agente y la composición de la reivindicación 1, en el que dicha composición se administra en las 48 horas posteriores a dicho agente.
- 10 4. El agente y la composición de la reivindicación 1, en el que dicha composición se administra en las 24 horas posteriores a dicho agente.
5. El agente y la composición de la reivindicación 1, en el que dicha composición se administra en las 12 horas posteriores a dicho agente.
6. El agente y la composición de la reivindicación 1, en el que dicha composición se administra en las 3-12 horas posteriores a dicho agente.
- 15 7. El agente y la composición de la reivindicación 1, en el que dicha composición se administra durante un periodo de tiempo preseleccionado.
8. El agente y la composición de la reivindicación 7, en el que dicho periodo de tiempo preseleccionado es 1 a 2 días.
9. El agente y la composición de la reivindicación 1, en el que la dosis de dicho agente es sub-terapéutica.
10. El agente y la composición de la reivindicación 1, en el que la dosis de dicho inhibidor de IGF-1R es sub-terapéutica.
- 20 11. El agente y la composición de la reivindicación 1, en el que la dosis de dicho inhibidor de IGF-1R es en una cantidad suficiente para causar hiperglucemia, cetosis o glucosuria.
12. El agente y la composición de la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor de IGF-1R es ADW-742.
13. El agente y la composición de la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor de IGF-1R es NVP-AEW541.
- 25 14. Uso de un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico y una composición que comprende un inhibidor del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1R) para usarse en la fabricación de un medicamento de combinación para inhibir el crecimiento de células de mieloma múltiple en un sujeto, en el que dicho inhibidor de IGF-1R es ADW-742 o NVP-AEW541.
15. El uso de la reivindicación 14, en el que dicha composición se administra simultáneamente con dicho agente.
- 30 16. El uso de la reivindicación 14, en el que dicha composición se administra en las 48 horas, opcionalmente en las 24 horas, preferiblemente en las 12 horas y más preferiblemente en las 3-12 horas posteriores a dicho agente.
17. El uso de la reivindicación 14, en el que dicha composición se administra durante un periodo de tiempo preseleccionado.
18. El uso de la reivindicación 17, en el que dicho periodo de tiempo preseleccionado es 1 a 2 días.
19. El uso de la reivindicación 14, en el que la dosis de dicho agente es sub-terapéutica.
- 35 20. El uso de la reivindicación 14, en el que la dosis de dicho inhibidor de IGF-1R es sub-terapéutica.
21. El uso de la reivindicación 14, en el que la dosis de dicho inhibidor de IGF-1R es en una cantidad suficiente para causar hiperglucemia, cetosis o glucosuria.
22. El uso de la reivindicación 14, en el que dicho inhibidor de IGF-1R es ADW-742.
23. El uso de la reivindicación 14, en el que dicho inhibidor de IGF-1R es NVP-AEW541.

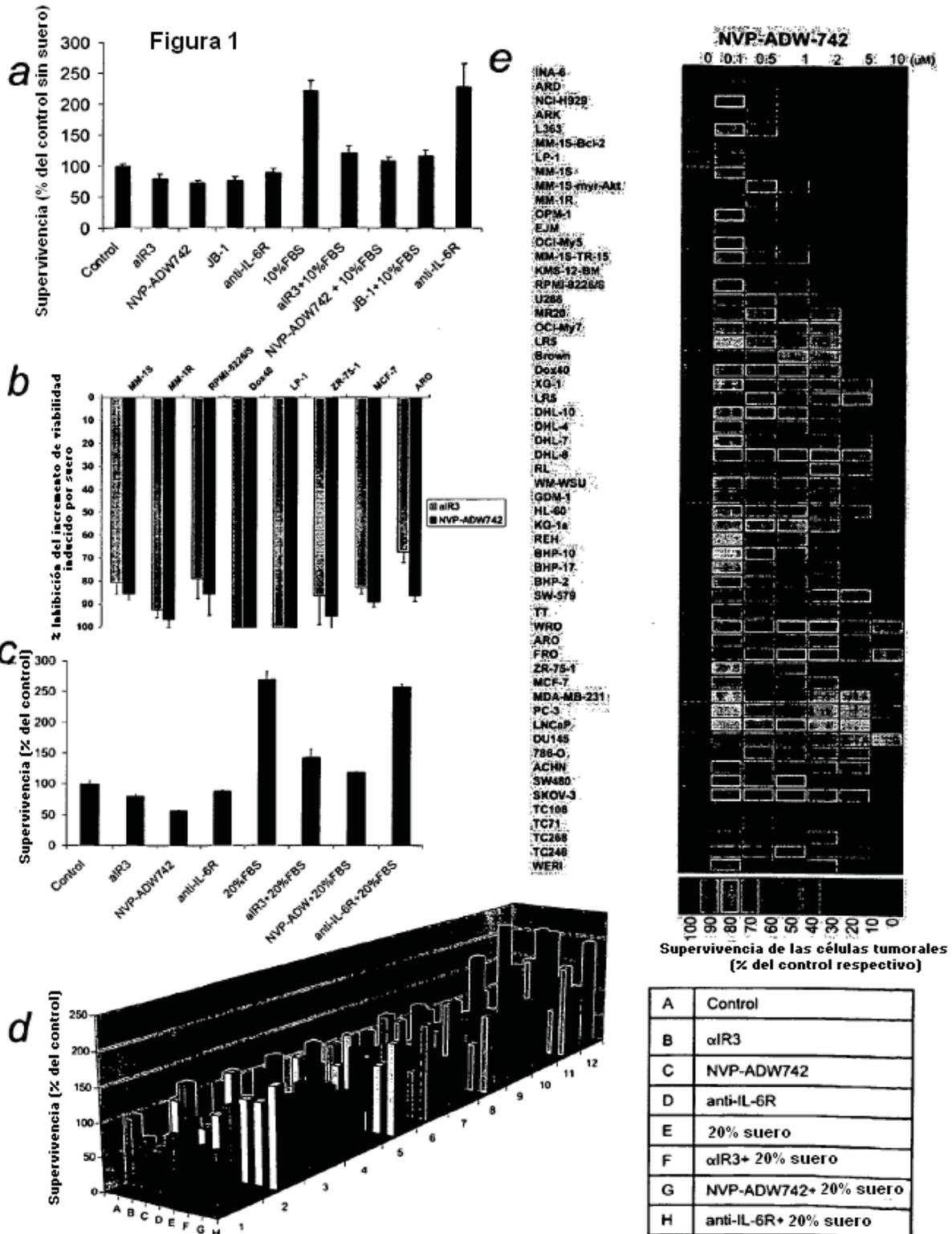
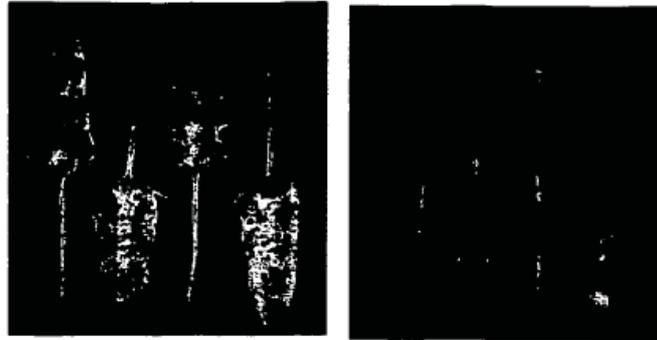
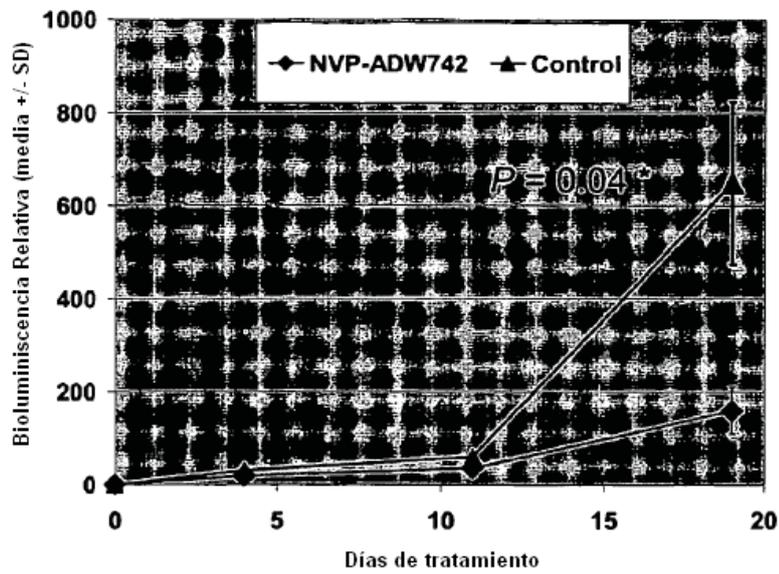


Figura 2

a



b



c

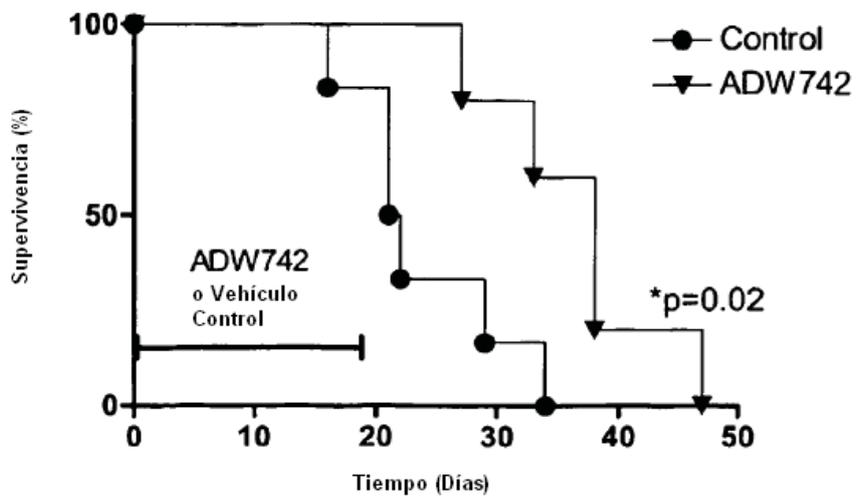


Figura 3

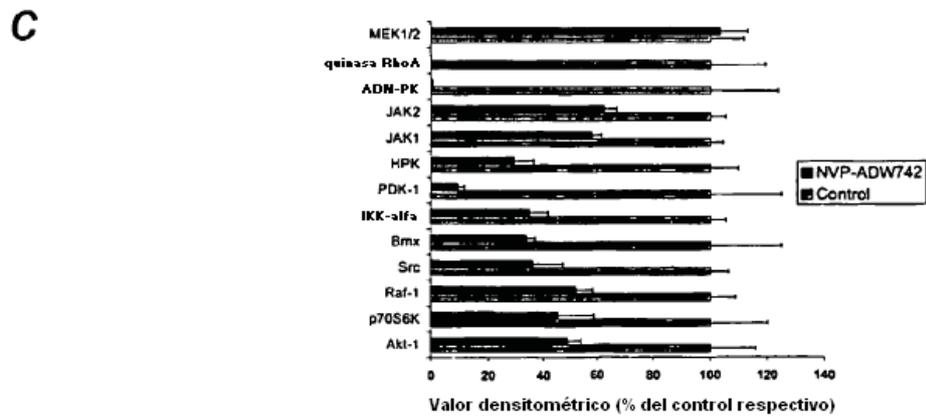
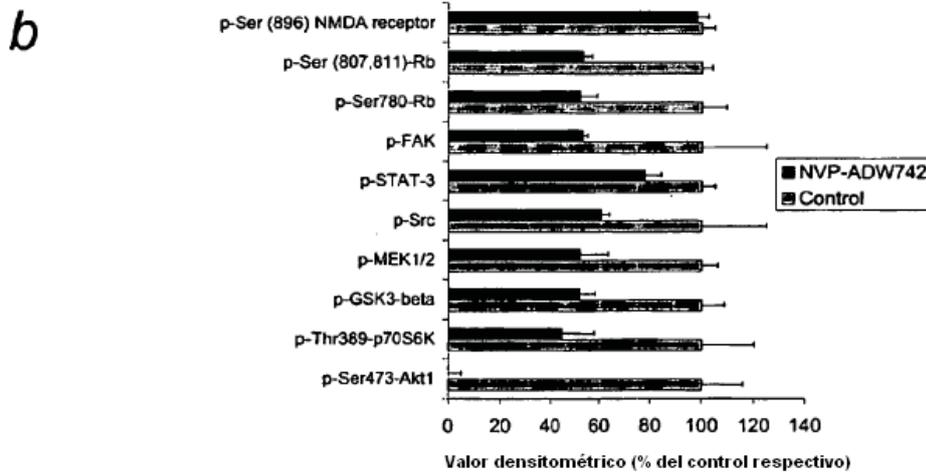
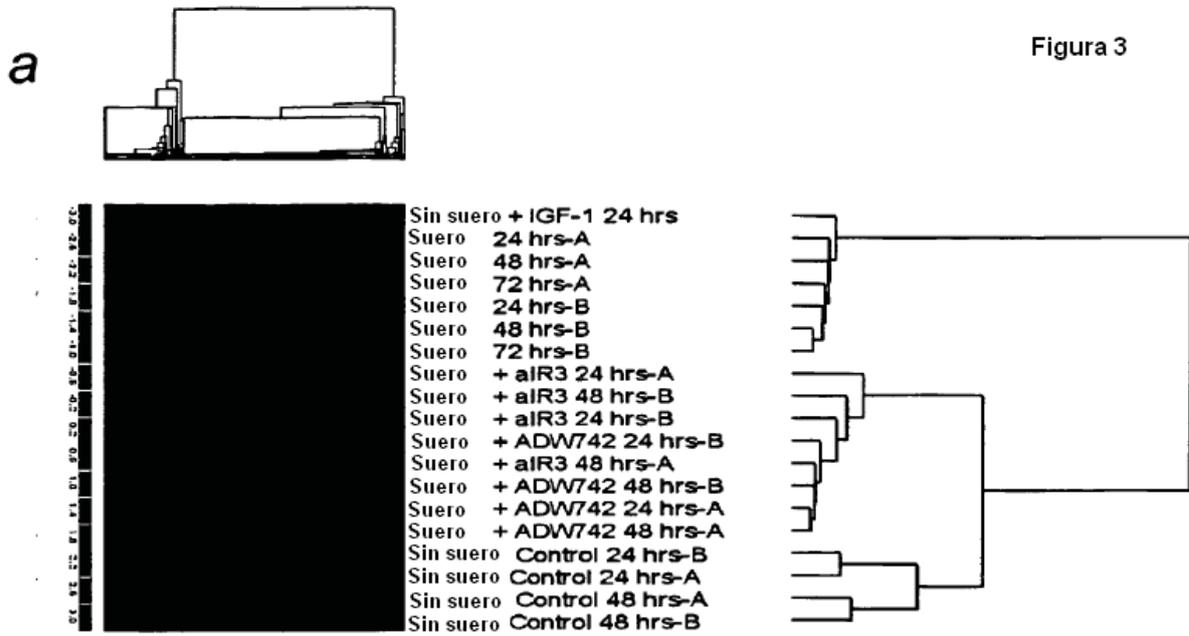


Figura 4

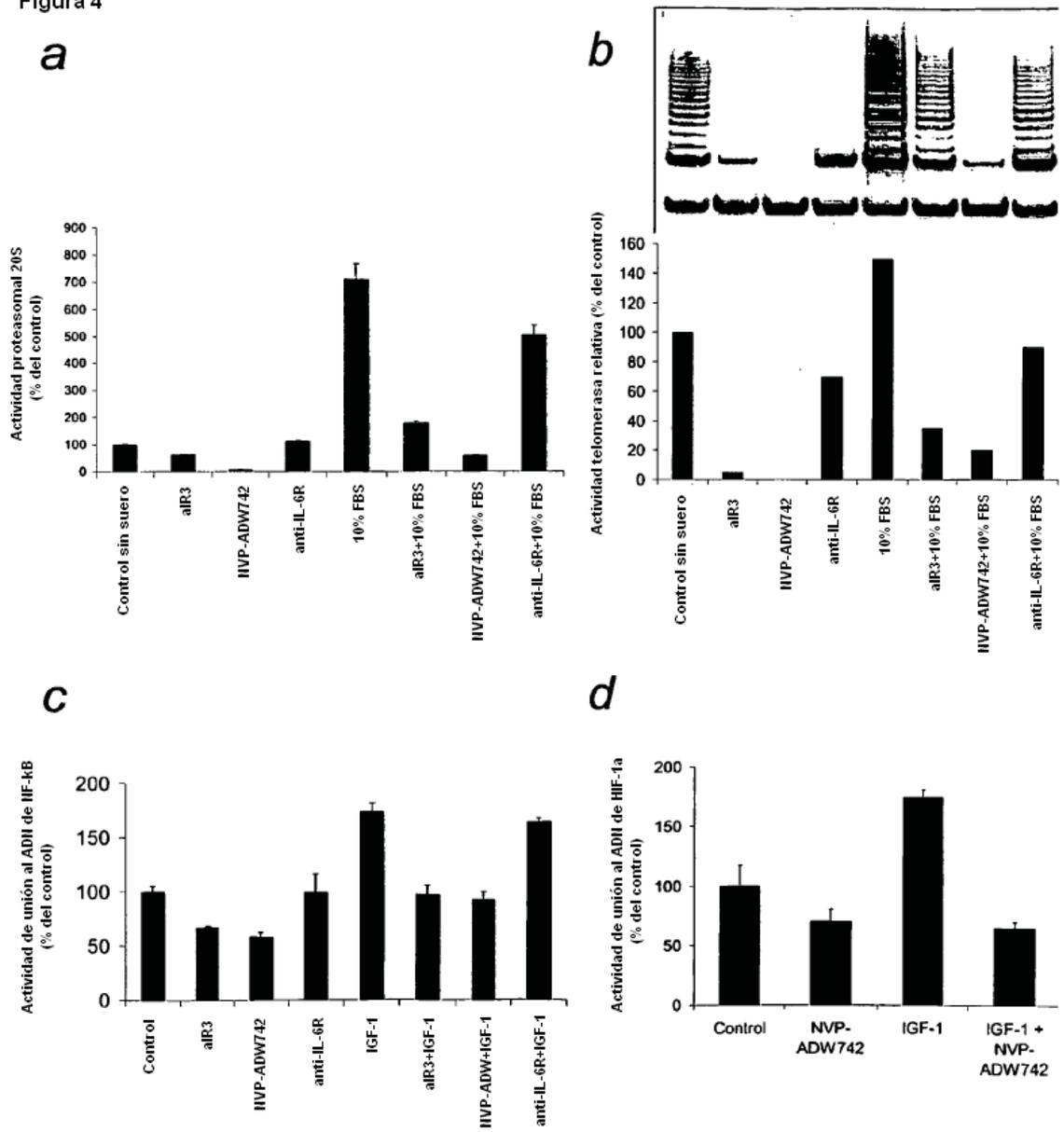


Figura 5

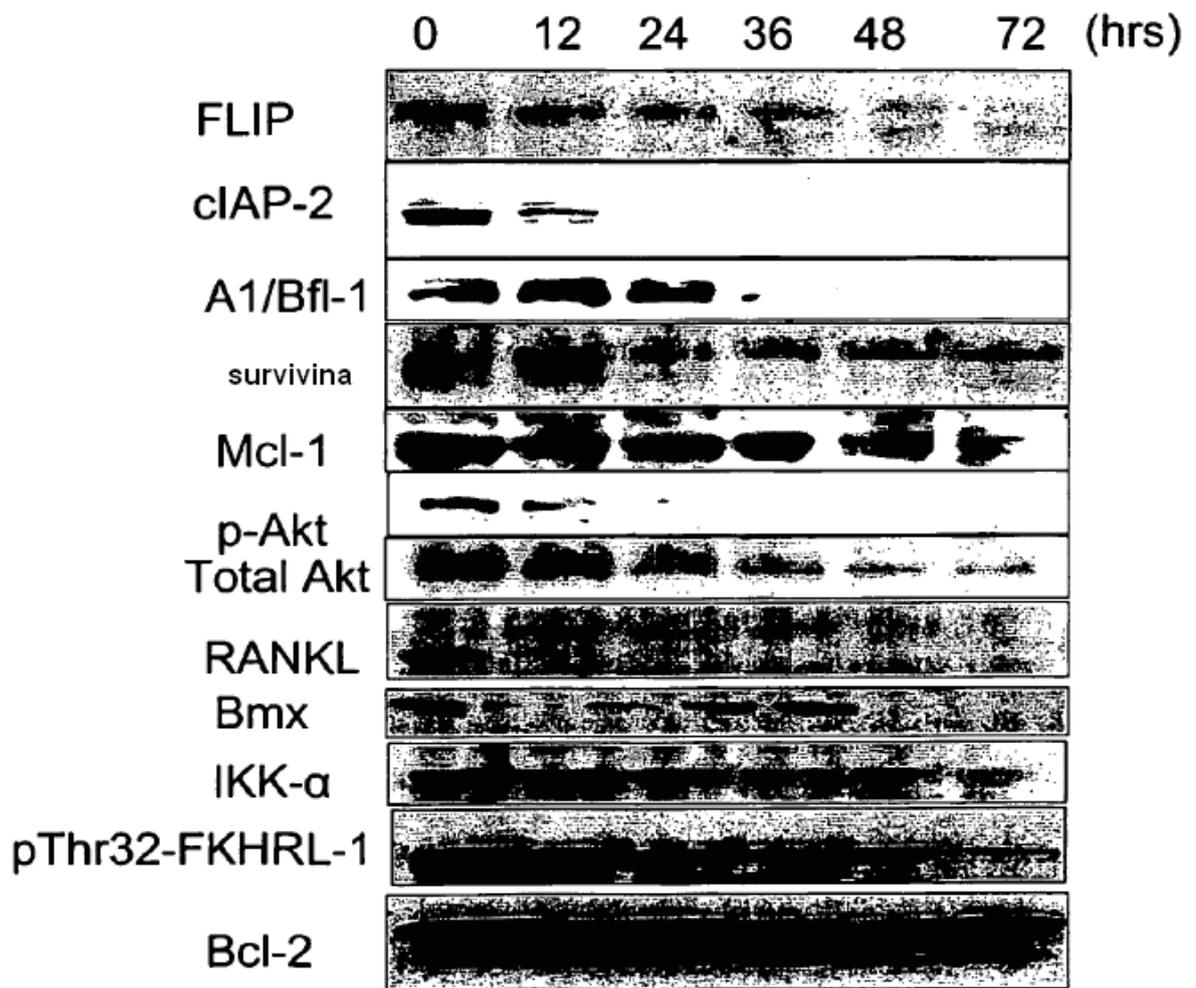
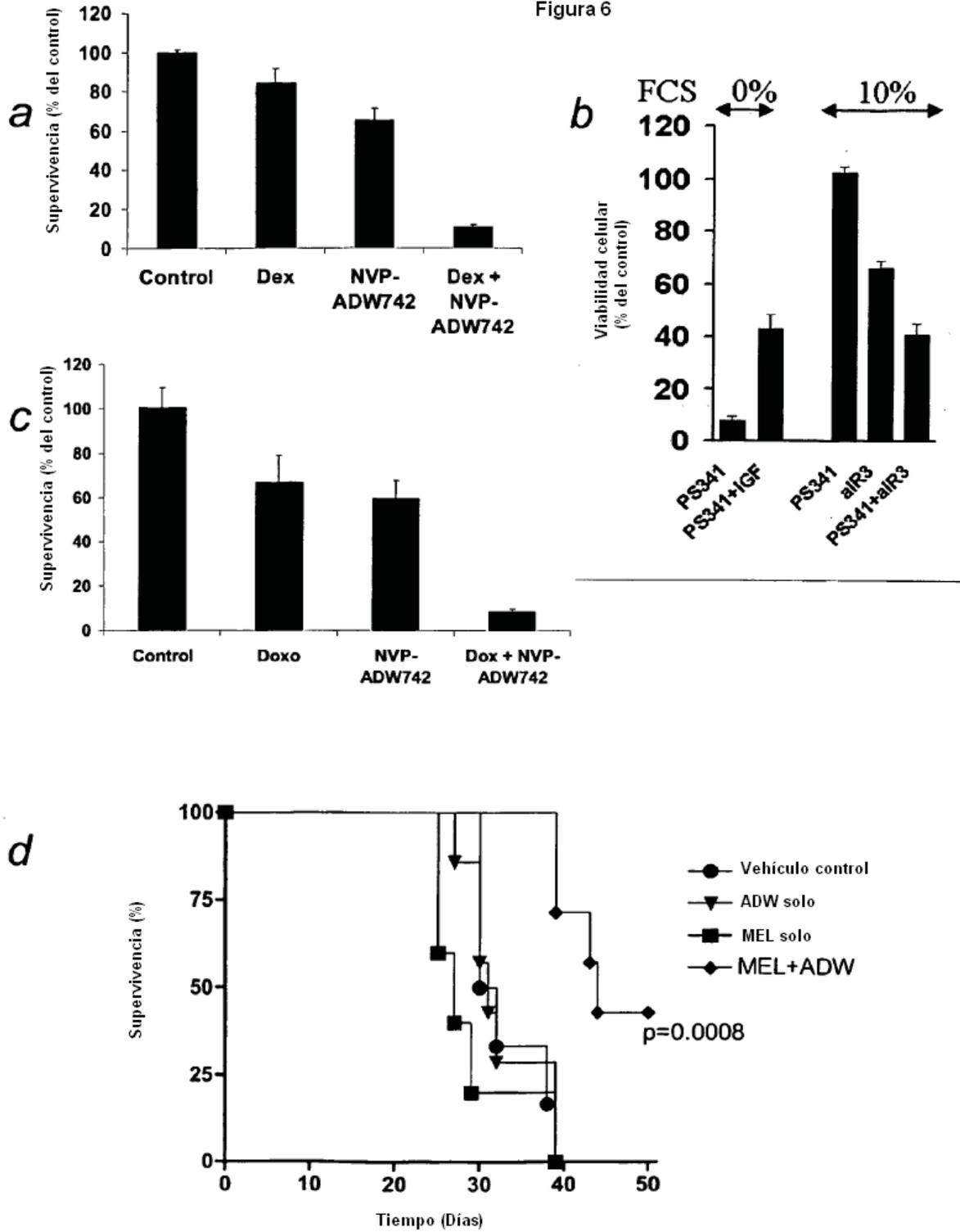
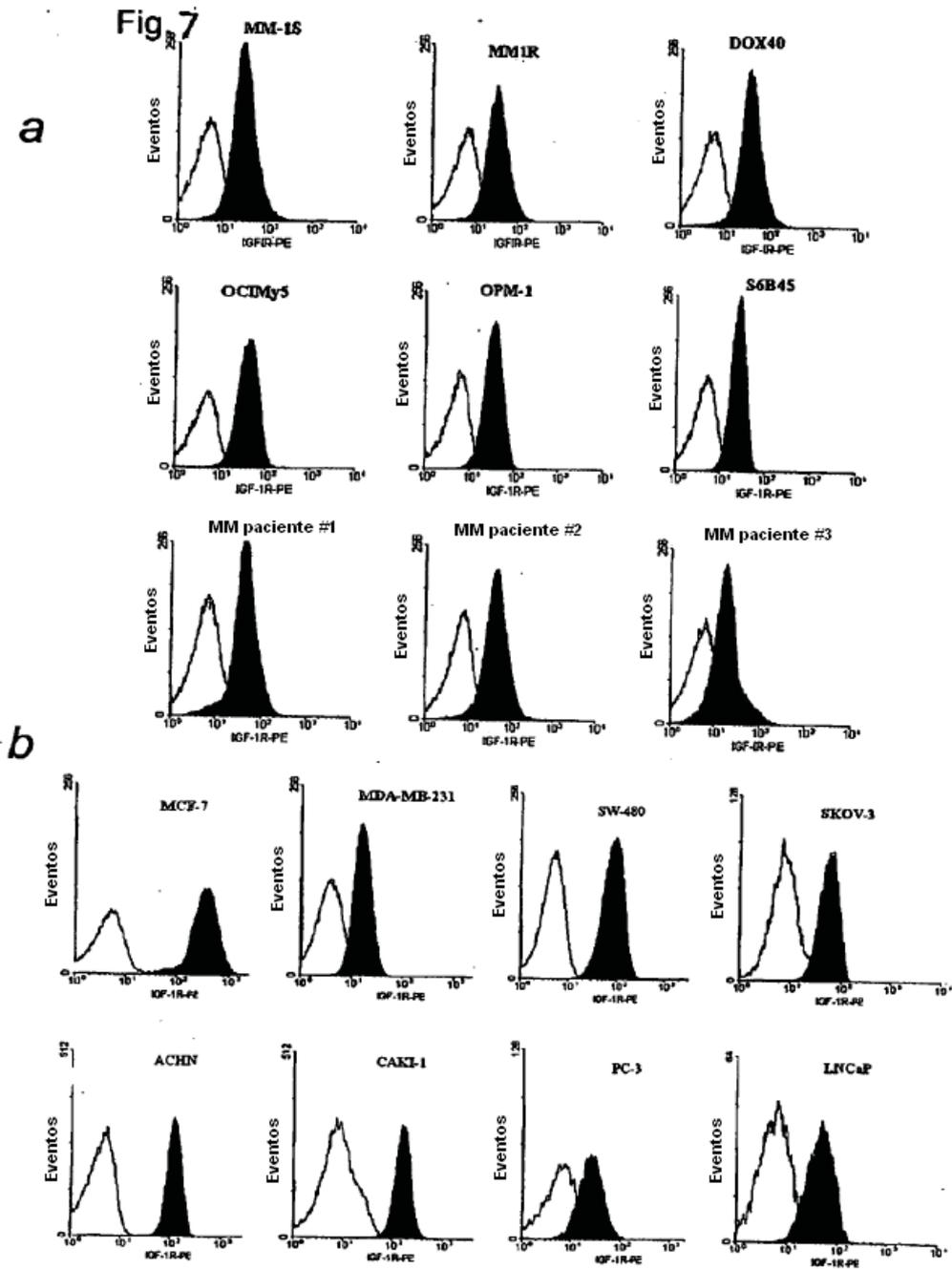


Figura 6





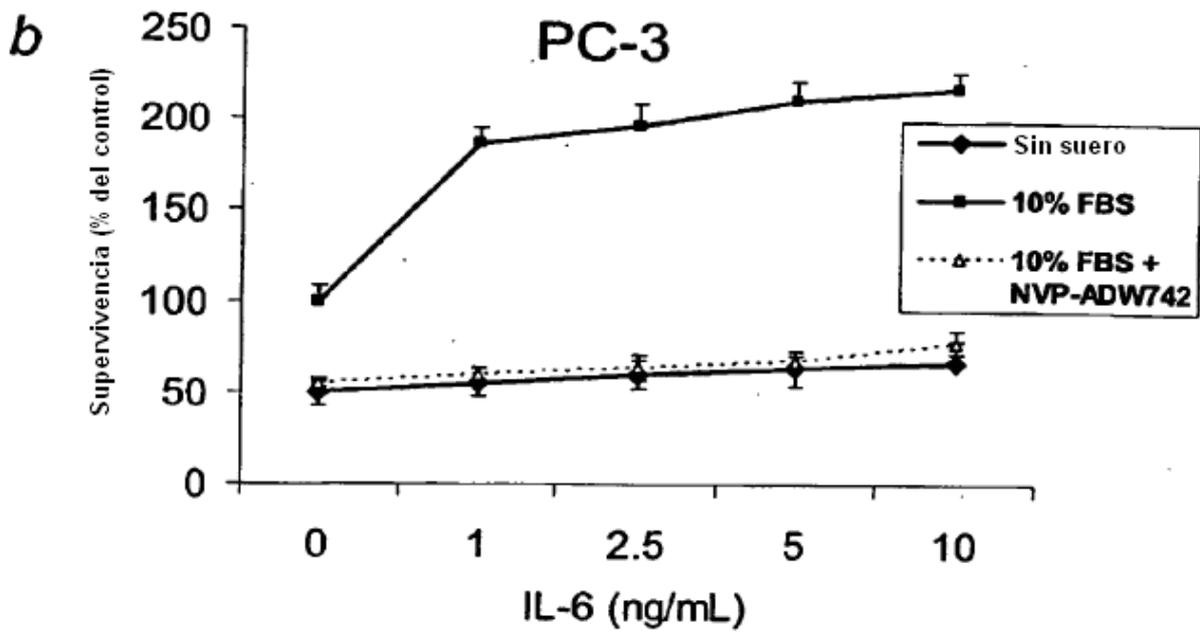
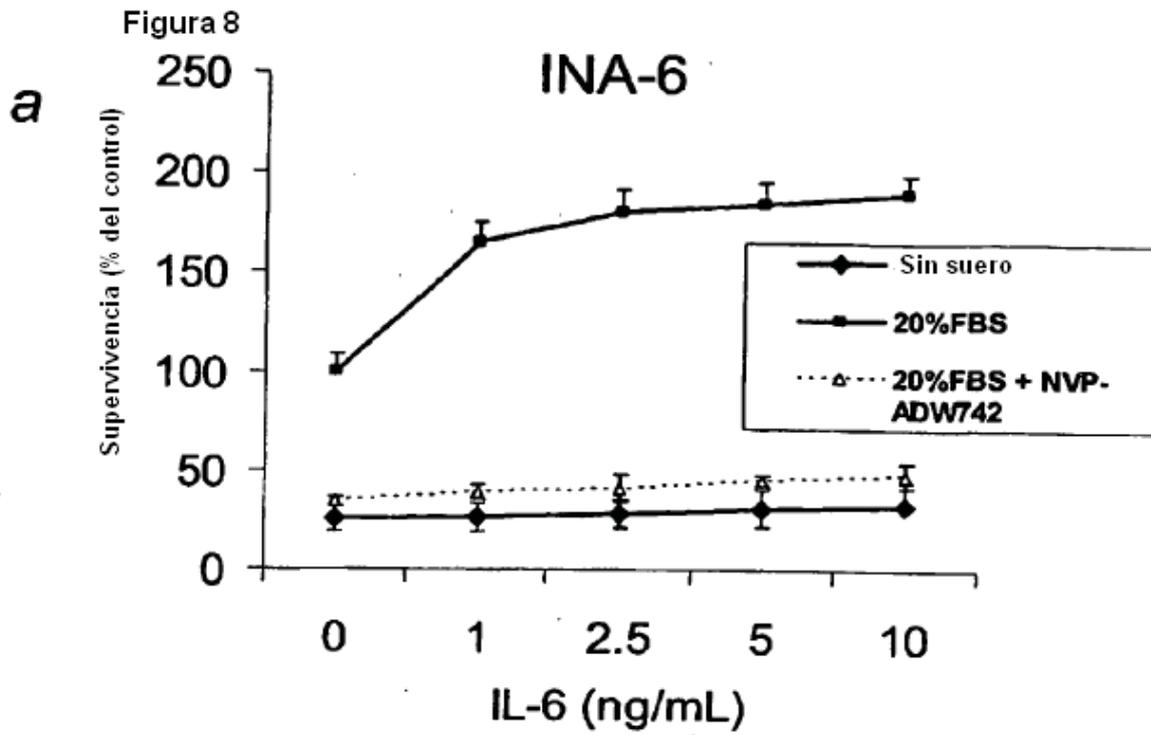
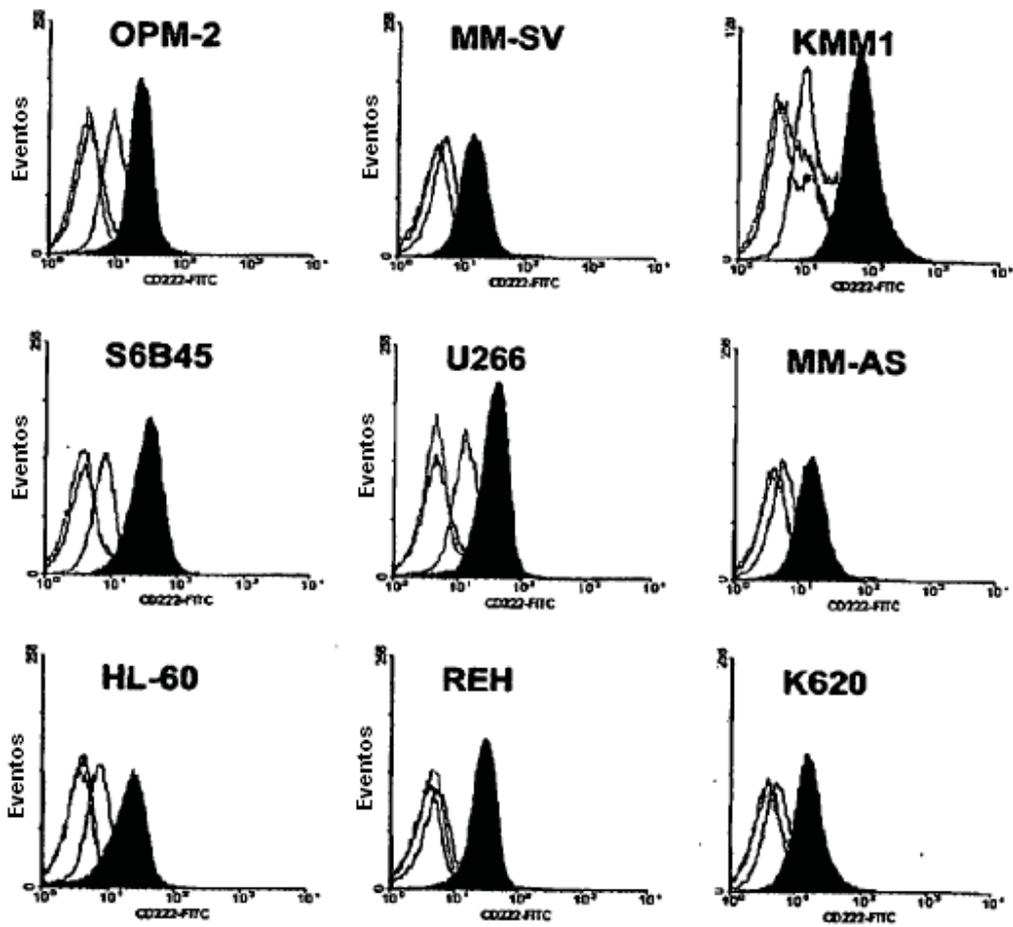


Fig.9



ES 2 368 741 T3

Figura 10

Firma transcripcional de la estimulación con IGF-1

	Regulado al alza	Regulado a la baja
Señalización celular	CK-1 y -2, factor semejante a quimioquina 1, CXCR-4, Aurora-1, Aurora-2, SAK, SGK, PP2A, algunas subunidades PP1, PP4, GADD- α y - β , PTEN, CD71	FLIP, c-raf1 (pero regulado al alza a nivel de proteína), Gas6, IGF-1, IGF-1R, IGF-2R, IFN-a, b, receptor omega, IL-2R γ , gp130, RAR- α , RAR- γ , BCMA, proteína inducida por TNF-a
Regulación de la apoptosis	Survivina, Bad, PCD5, PCD8, PCD10, VDAC3	Bcl-2 (sin efecto en el nivel de proteína en estimulación a corto a medio plazo), Mcl-1 (niveles estables de proteína), TOSO
Control del ciclo celular	Ki-67, CDC-2, -5, -6, -7, -20, -23, -25, -28, -45, ciclinas A2, B1, B2, E1, F, G1, (D1, D2, D3), CDK2, CDK4, PCNA, factor de replicación C (múltiples subunidades), proteínas de replicación A1, A2 y A3, ASK, CHK1, expresada en G2-S 1, estatmina/oncoproteína 1, Wee1+	
Interacciones con el microentorno	RHAMM, Integrina α E, ADAM-8, -22, -28	Integrina α 8, α L, β 1, β 5
Ruta de señalización Wnt		Proteína relacionada con frizzled, WNT10B, WNT5B
Control de la transcripción/traducción	ATF-1, ATF-3, E2F-3, eIF-1, -2, -3, -4 y -5, múltiples proteínas ribosomales, DP-1, c-myb, XBP-1	c-myc
Enzimas de síntesis/reparación del ADN	BUB1, BUB3, ADN-PK, desoxicitidina quinasa, desoxitimilato quinasa, DHFR, disquerina, dUTP pirofosfatasa, MCM 2, 3, 4, 5, 6, 7, MSH-2, -3, -6, RAD51, guanina monofosfato sintasa, RRM1, RRM2, TOPOIIA, XRCC	
Regulación de histonas	HDAC1, HAT1	
Oncogenes	DEK, gen de fusión de liposarcoma t(12;16), translocación de SET	
Proteínas de choque térmico/Chaperonas	Hsp90, -70, 105, 27, 110, 14-3-3, chaperonina TCP1	
Interacciones con el sistema inmune		MHC clase IE y II (cambios menos extensos en comparación con IL-6 o co-CX)
Transporte nucleocitoplásmico y otras proteínas transportadoras	Exportina, nucleoporinas 50, 54, 62, 88, 98, 155, carioferinas b1, b3, a1, a2, a3, a4, semejantes a quinesina 1, 2, 4, 5, 6, 7 (múltiples proteínas Rab, Ran), transportinas	
Metabolismo	F0F1 ATPasa mitocondrial, ornitina descarboxilasa, HMG-CoA reductasa, calmodulina-1 y -2	
Ruta de Ubiquitina/Proteasoma	POH, Múltiples genes de la subunidad 26S (subunidades de 26S α 1, α 2, α 3, α 5, α 7, β 1, β 2, β 3, β 5, β 6, β 7, β 8, ATPasa 1, 2, 3, 4, 5, 6, no ATPasa 1, 2, 4, 7, 8, 11, 12, 13), UCE, USP	Algunos USP (-9, -11)

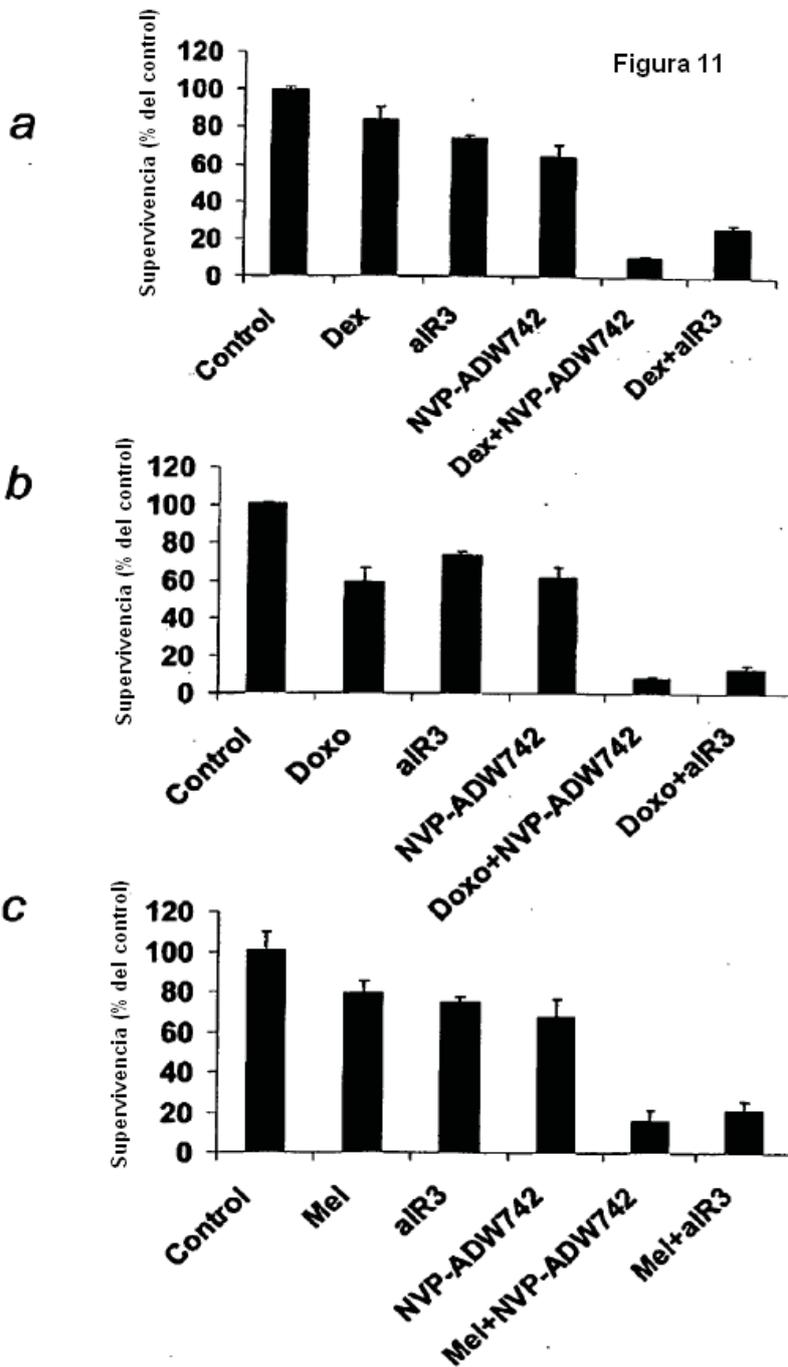
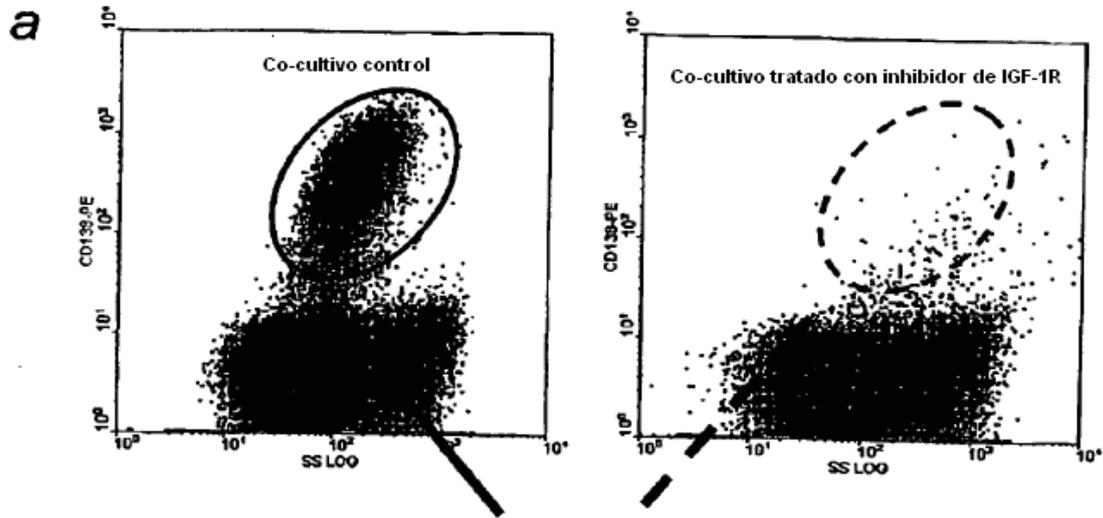


Figura 12



Población de células tumorales MM CD138⁺

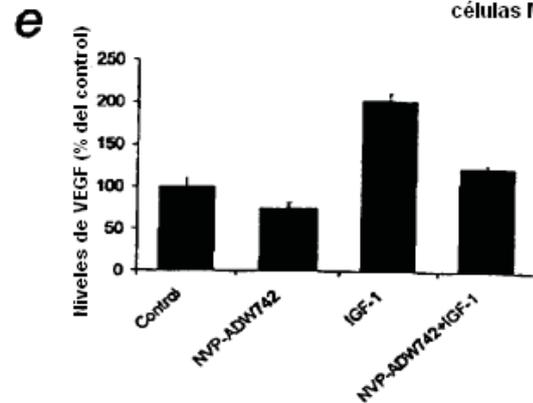
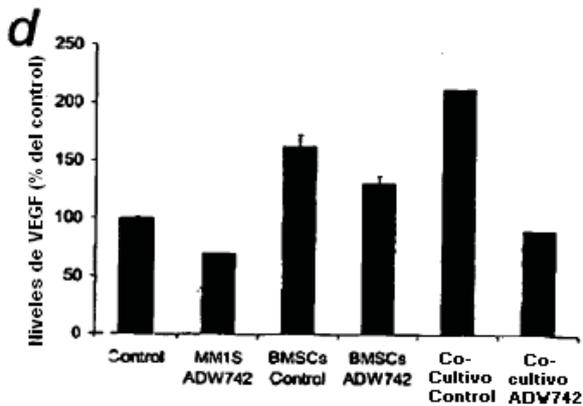
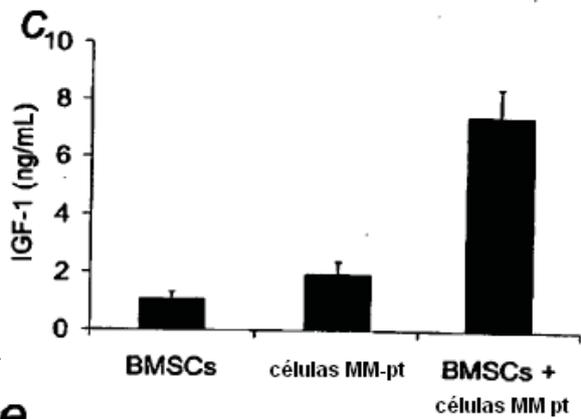
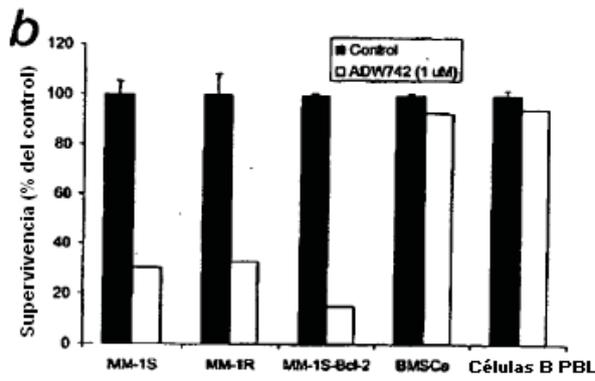


Figura 13

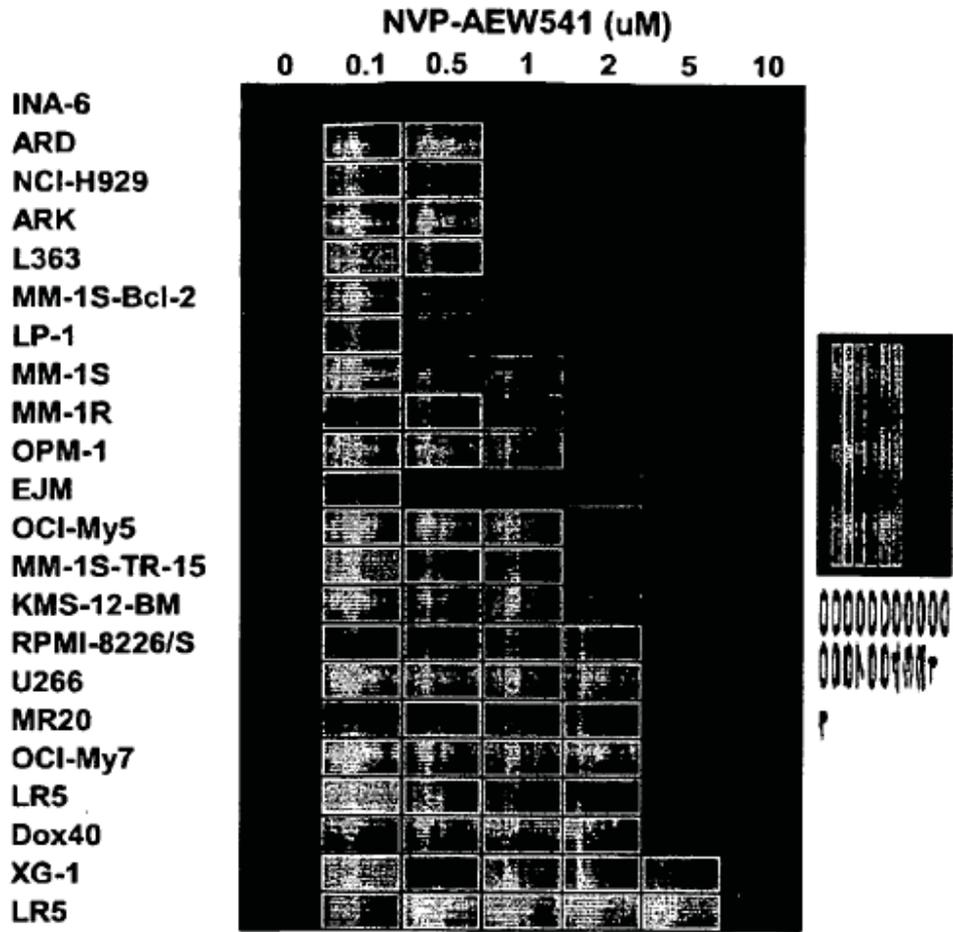


Figura 14

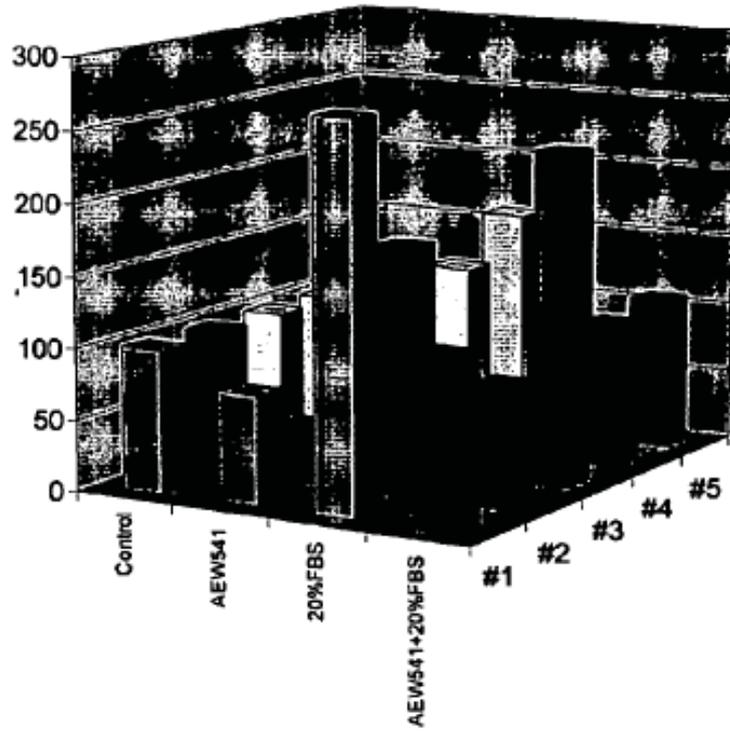


Figura 15

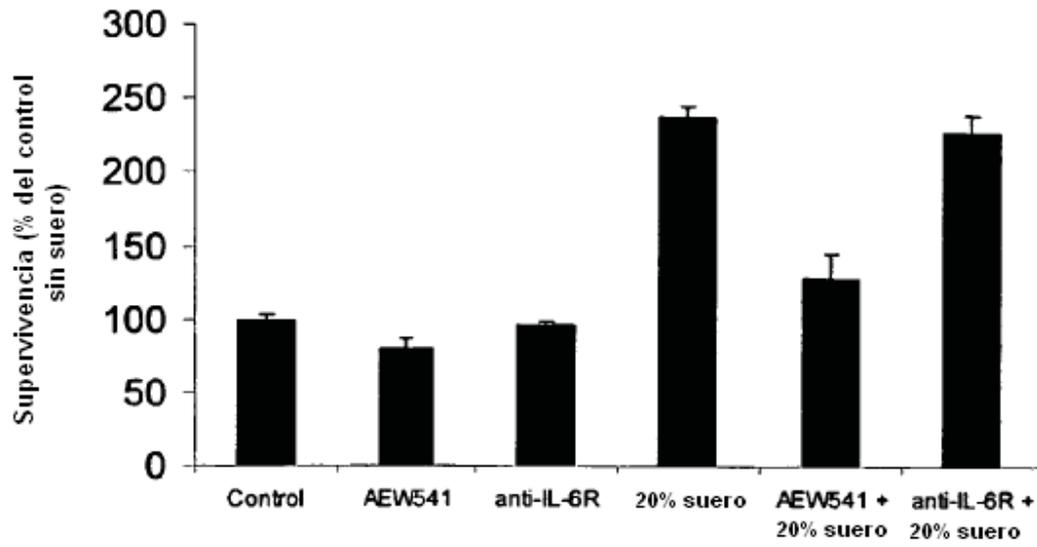


Figura 16

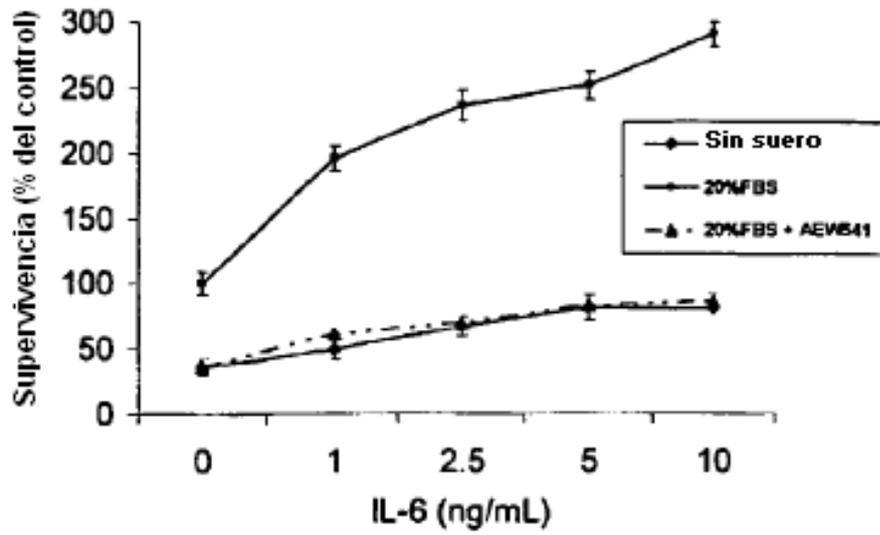


Figura 17

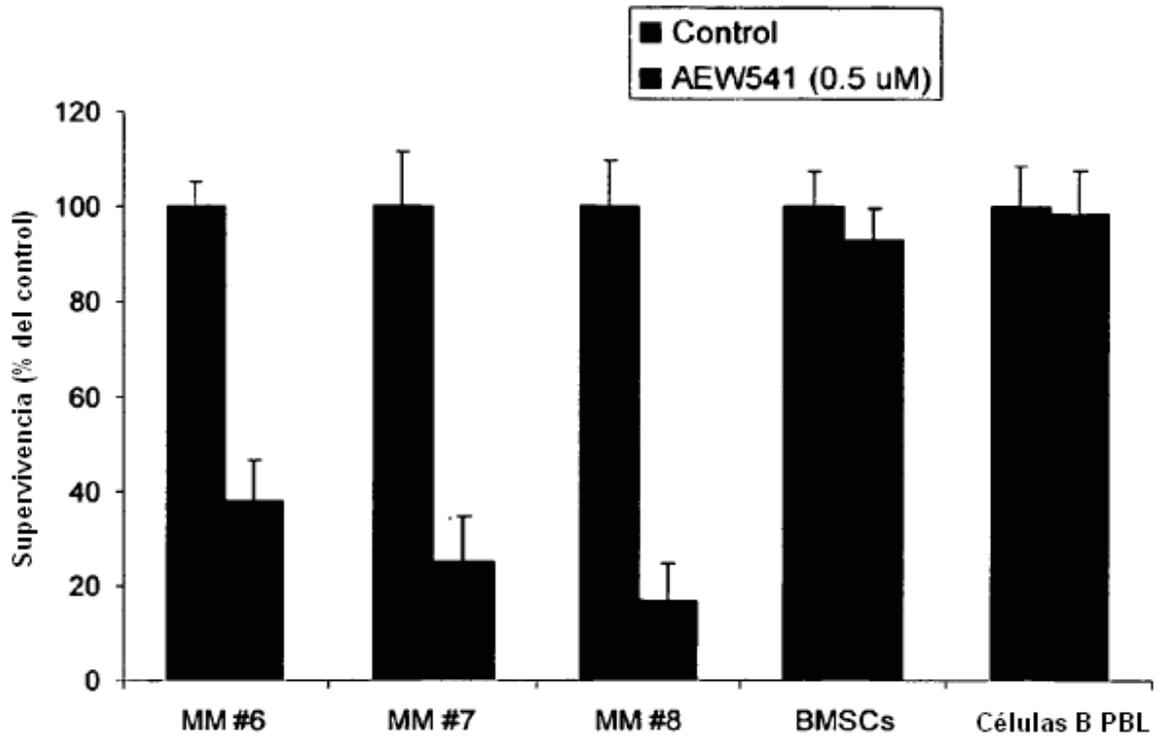


Figura 18

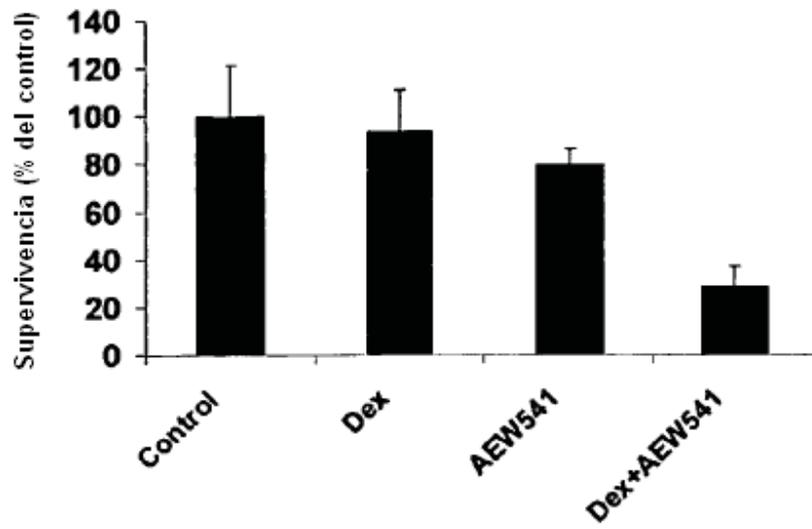


Figura 19

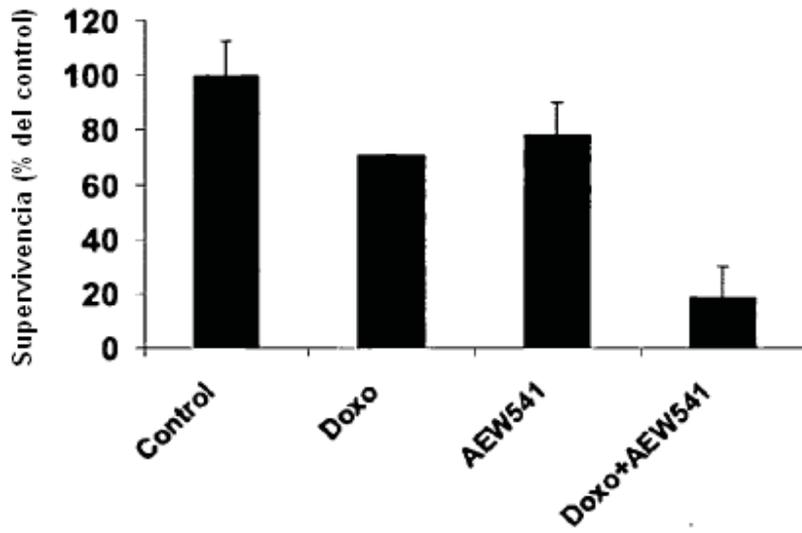


Figura 20

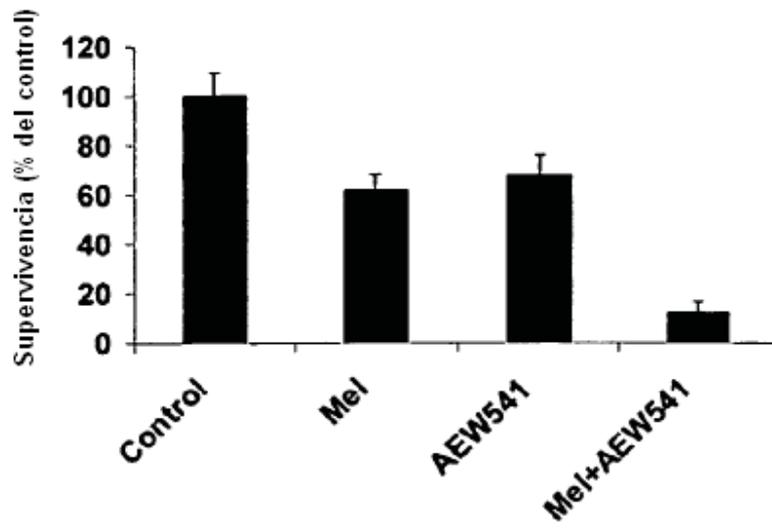


Figura 21

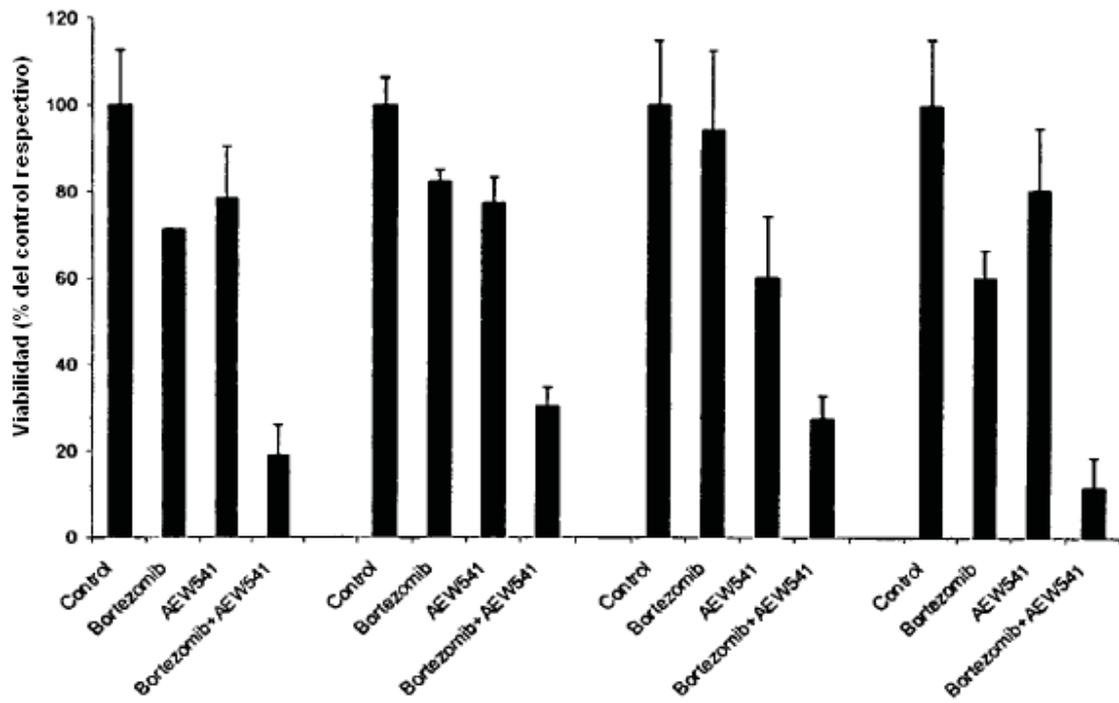


Figura 22

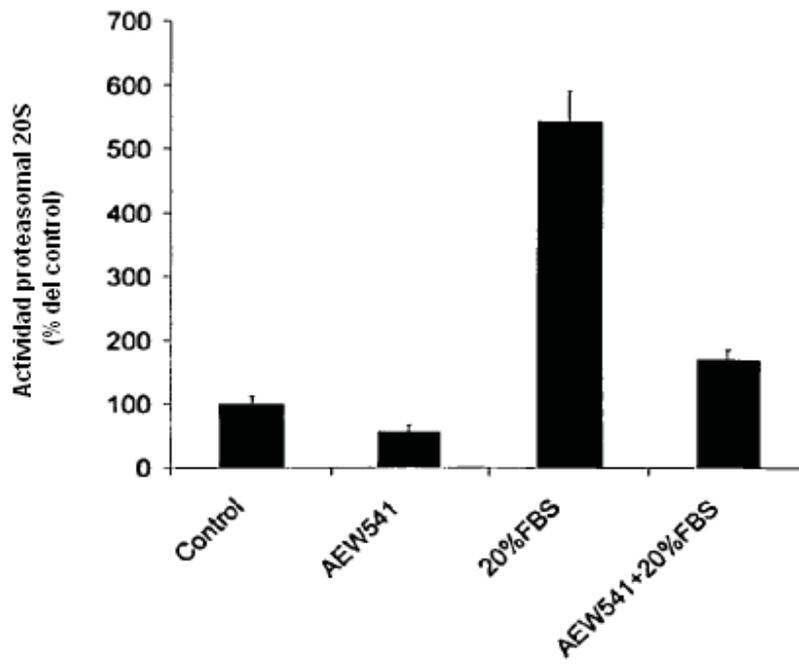


Figura 23

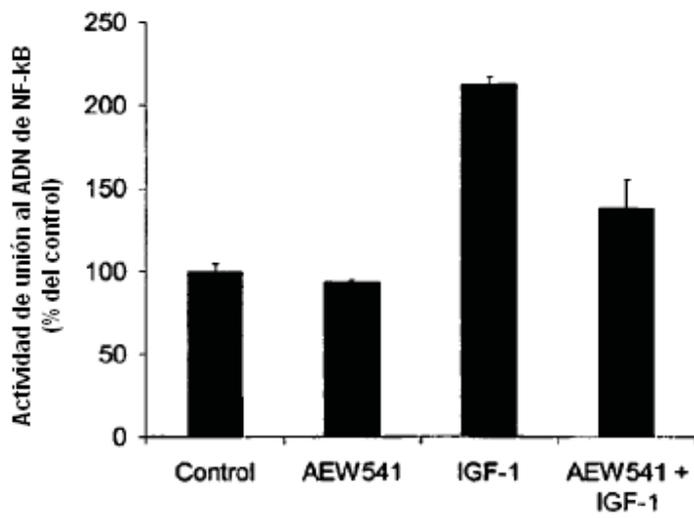


Figura 24

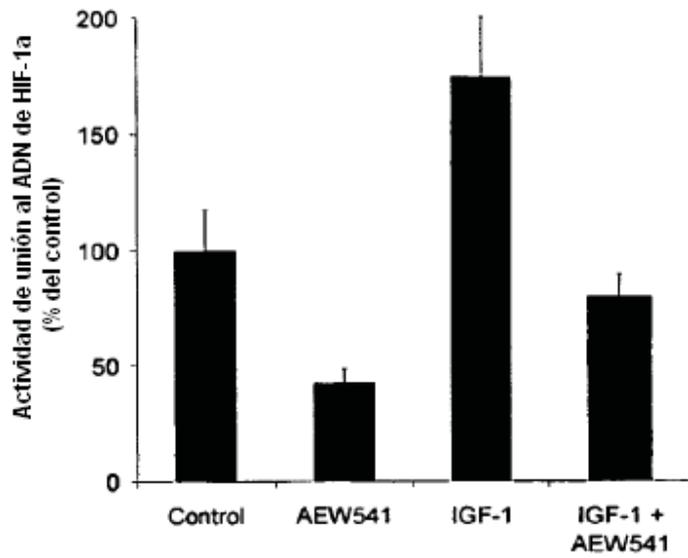


Figura 25

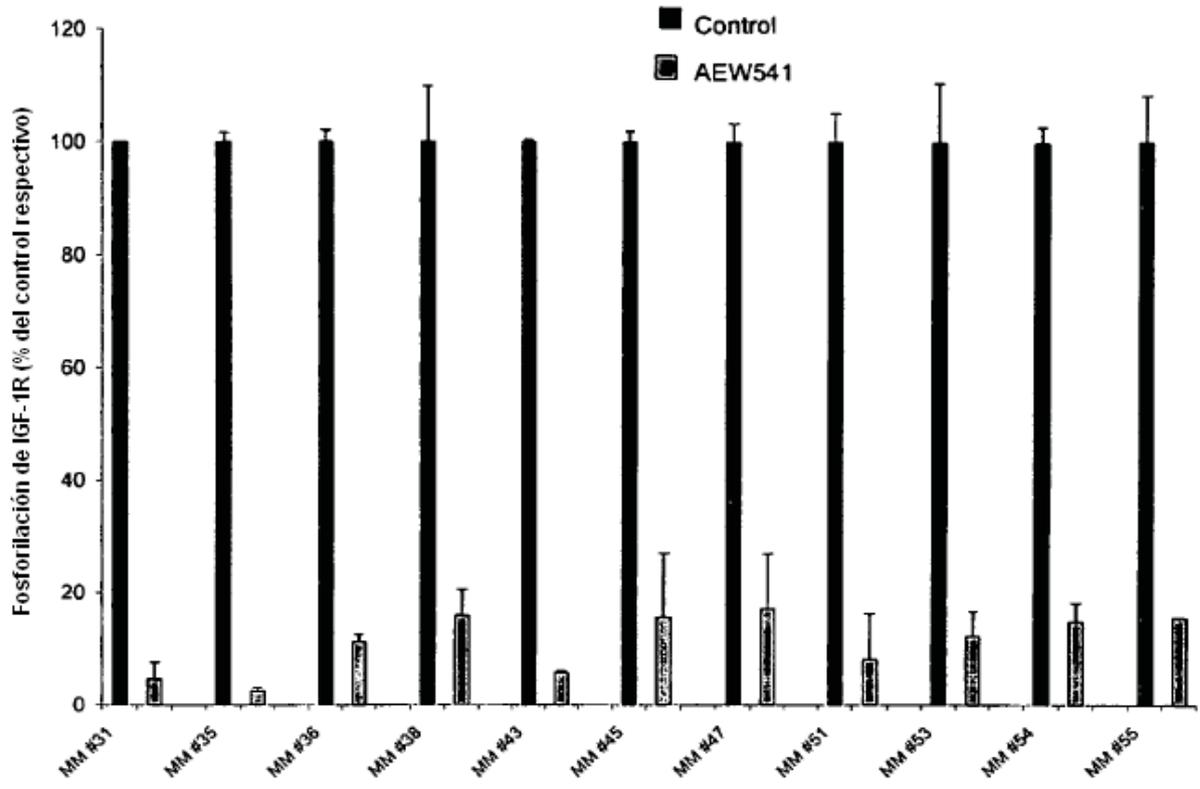
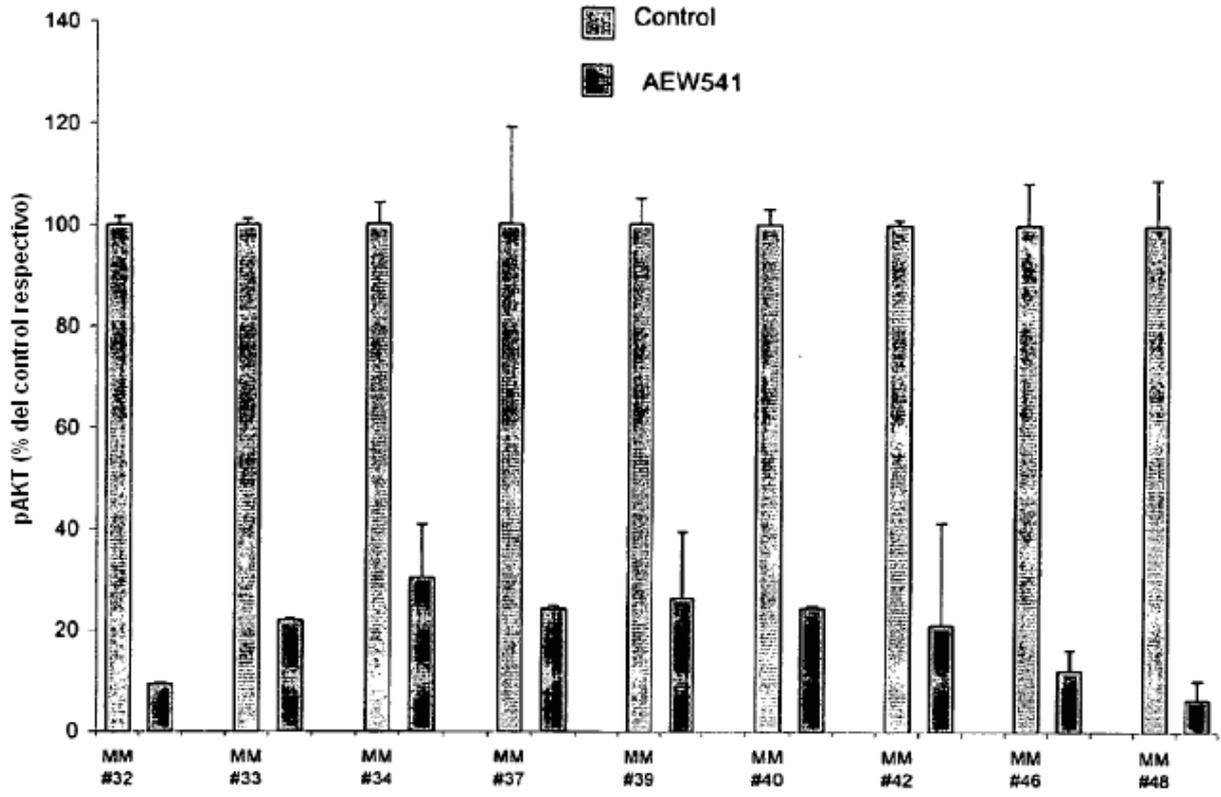


Figura 26



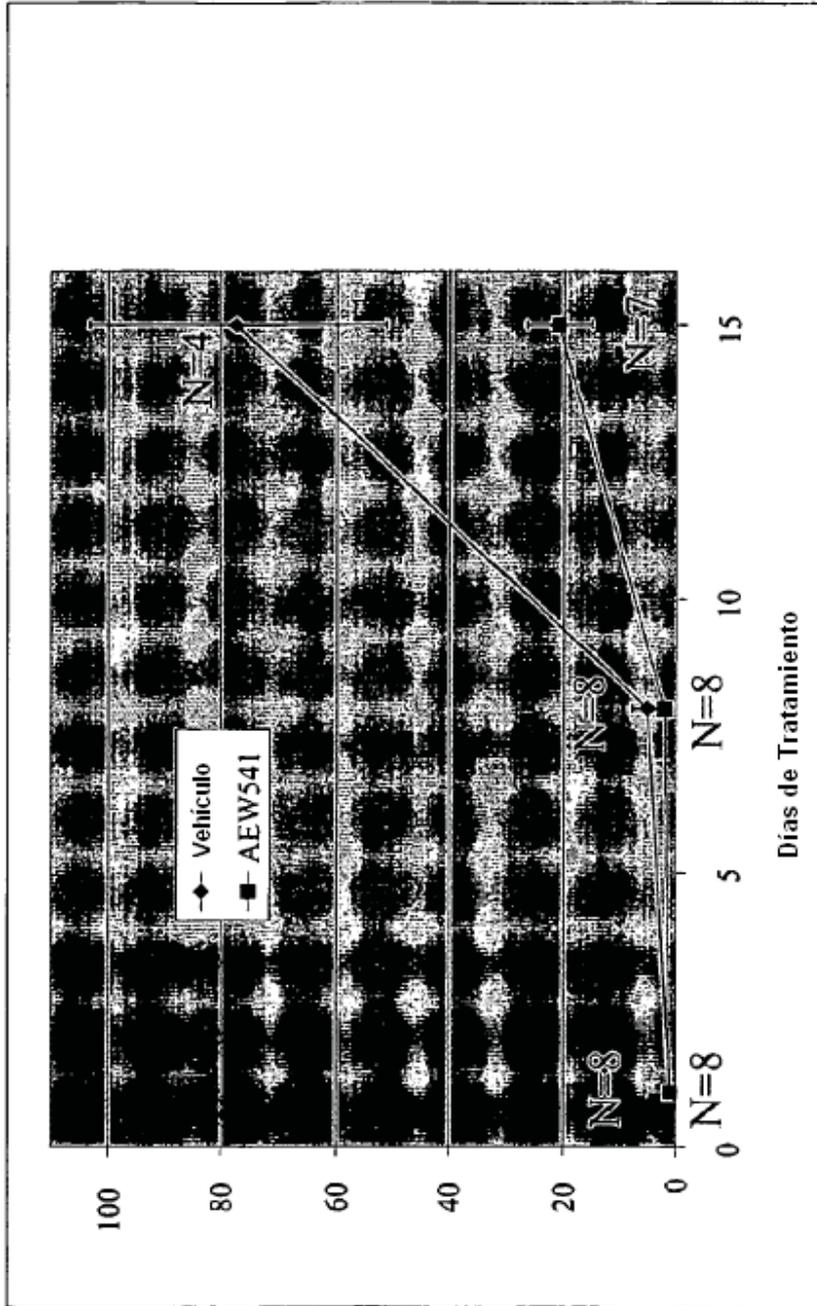


Figura 27

Figura 28

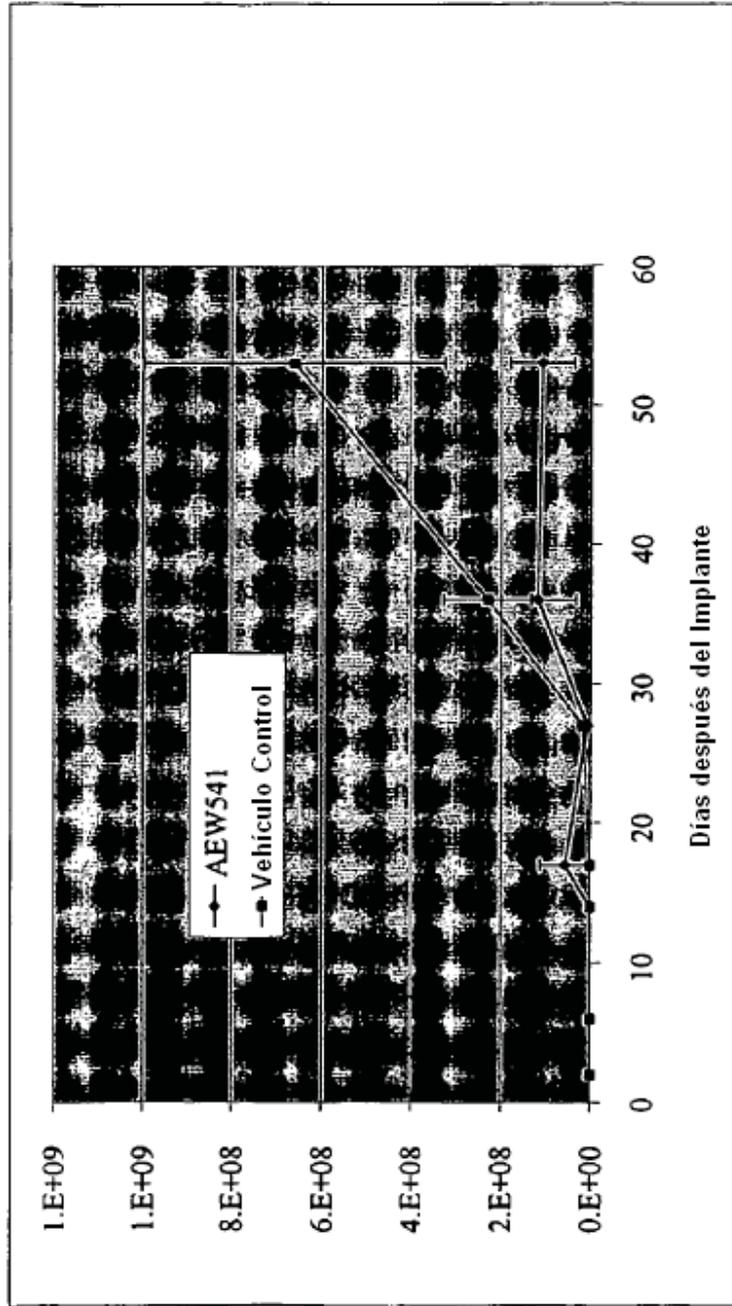


Figura 29

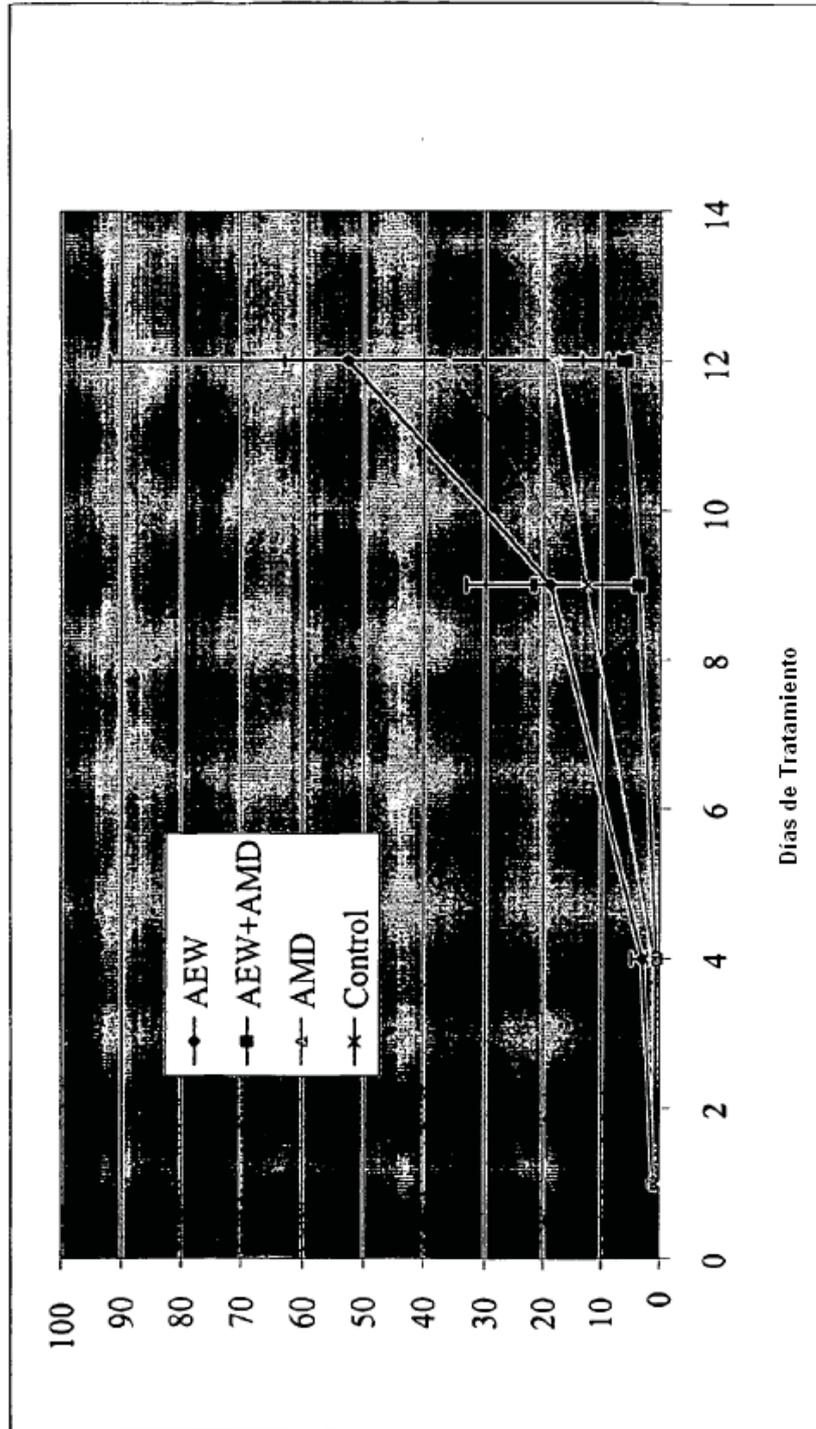
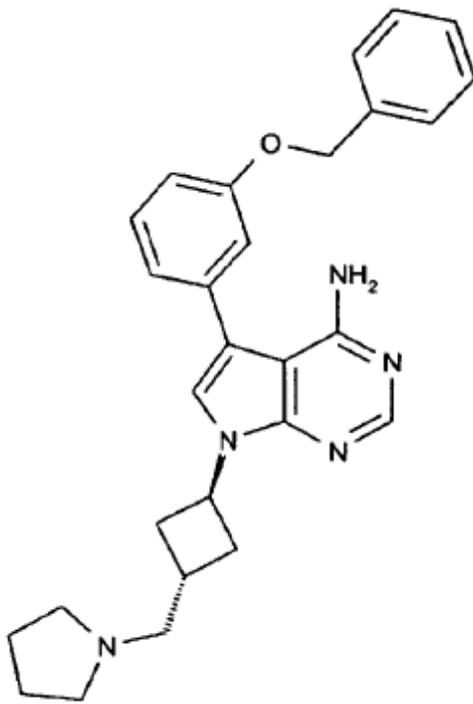
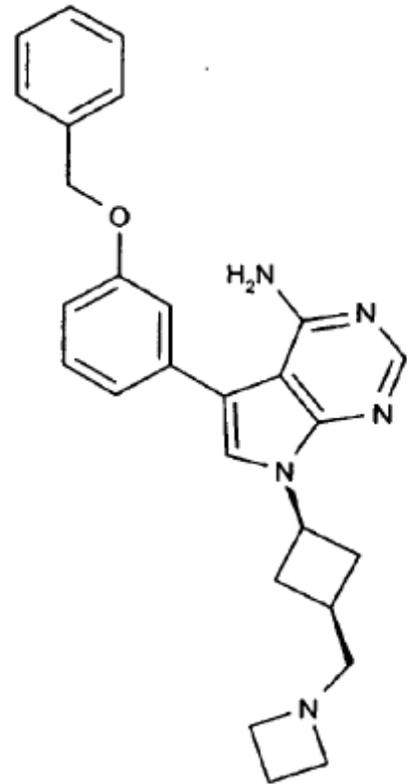


Figura 30



ADW742

5-(3-Benciloxi-fenil)-7-(3-pirrolidin-1-ilmetil-ciclobutil)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina



AEW541

7-(3-Azetidin-1-ilmetil-ciclobutil)-5-(3-benciloxi-fenil)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-ilamina